



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학박사 학위논문

발효더덕 추출물이 인지기능에
미치는 영향

**Effects of Fermented *Codonopsis lanceolata*
extract on Cognitive Function**

2017 년 2 월

서울대학교 대학원

자연과학대학 협동과정 뇌과학전공

김 빈 나

초 록

서론: 인지기능 향상을 위한 기능성 식품 섭취는 안전성이 확보되어 있으며 접근이 용이한 중재 방법으로서 그 수요가 증가하고 있다. 발효더덕은 증숙 및 발효과정을 통하여 더덕의 생리활성 효과를 증폭시킨 기능성 식품이다. 세포 및 동물을 대상으로 한 선행연구에서 발효더덕의 항산화 효과와 인지기능 개선 효과가 꾸준히 보고되었으나 아직까지 사람을 대상으로 한 연구는 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 동물행동실험 및 인체적용시험을 통하여 발효더덕 추출물의 경구투여가 갖는 인지기능 개선 효과를 평가하고자 하였다.

방법: 동물행동실험은 4 주령 수컷 ICR 생쥐를 대상으로 하였다. 실험동물은 일주일의 적응 기간 후 정상대조군, 스코폴라민 투여군, 타크린 투여군, 발효더덕 추출물 투여군 중 하나로 배정되었고 2 주간 증류수, 타크린 (10 mg/kg body weight) 또는 발효더덕 추출물 (800 mg/kg body weight)을 사전 경구투여하였다. 2 주 후 스코폴라민 (2 mg/kg body weight)으로 기억 손상을 유도한 후 인지기능 측정을 위해 Y-미로 실험을 실시하였다. 인지기능 측정 척도는 변경행동력으로 하였다.

인체적용시험은 만 20 세에서 65 세 사이의 주관적 인지기능 저하를 호소하는 반건강인 성인 남녀를 대상으로 8 주간 무작위, 이중맹검, 위약-대조 방법으로 시행하였다. 기저시점에서 연구 대상자는 발효더덕 추출물 고용량 투여군 (1050 mg/day, n=20), 발효더덕 추출물 저용량 투여군 (525 mg/day, n=20), 또는 위약대조군 (n=20) 중 하나로 무작위로 배정되었다. 기저시점 방문 시부터 총 8 주간 하루에 1 회 발효더덕

추출물 또는 위약을 경구복용 하였으며 4 주차 및 8 주차에 방문하여 추적 검사를 실시하였다. 인지기능 측정을 위한 신경인지기능 검사와 우울 및 불안 증상에 대한 검사는 기저시점과 8 주차에, 안전성 평가를 위한 종합 혈액검사 및 소변검사는 기저시점과 4 주차, 8 주차에 시행하였다.

인지기능 평가변수는 주의력과 작업기억력으로서 신경심리검사집인 K-WAIS III 와 CANTAB 중에서 해당 도메인을 평가할 수 있는 소검사들로부터 복합 Z 점수를 도출하였다. 안전성은 혈액검사, 소변검사 지표 및 자가보고 부작용 평가를 통하여 평가하였다. 또한 추가적인 탐색 분석으로 구조적 뇌 자기공명영상에 대한 복셀기반 형태분석을 통하여 8 주간 경구투여 이후 뇌 내 회백질 부피 변화엔 군 간 차이가 있는지 비교하였다.

결과: 동물행동실험에서 평균 변경행동력은 정상대조군, 스코폴라민 투여군, 타크린 투여군, 발효더덕 추출물 투여군에서 각각 55.4% (표준오차 1.5), 29.3% (표준오차 4.9), 46.2% (표준오차 2.5), 44.6% (표준오차 3.9) 였다. 스코폴라민에 의해 기억 손상이 성공적으로 유도되었으며 ($F=10.24, p<0.01$), 발효더덕 추출물을 사전 경구투여한 군에서 기억 손상이 회복되는 효과가 유의미하게 관찰되었다 (15.3%, $p=0.03$). 기억 손상의 회복 정도는 치매 치료제인 타크린에 의한 향상과 비슷한 수준이었다.

인체적용시험에서 8 주간의 발효더덕 추출물을 복용 후, 투여 용량에 상관 없이 발효더덕 추출물을 투여한 군은 위약대조군에 비해서 주의력이 유의하게 증가한 것으로 나타났다 (고용량 투여군, $z=2.18, p$ for interaction=0.03; 저용량 투여군, $z=2.10, p$ for interaction=0.04). 발효더덕

고용량 투여군과 저용량 투여군 사이에는 유의한 차이가 관찰되지 않아 주의력 향상 정도는 투여 용량에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다 ($z=0.05$, p for interaction= 0.96). 군 내에서 시간에 따른 변화를 분석하였을 때는 발효더덕 투여군은 둘 다 주의력이 유의하게 향상된 반면 (고용량 투여군, $z=4.26$, p for time effect <0.01 ; 저용량 투여군, $z=4.07$, p for time effect <0.01) 위약군에서는 시간에 따른 변화가 관찰되지 않았다 ($z=1.18$, p for time effect= 0.24).

8 주간의 발효더덕 추출물 복용 이후 작업기억력은 발효더덕 추출물 투여군 및 위약대조군 모두에서 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다 (고용량 투여군, $z=1.38$, p for time effect= 0.17 ; 저용량 투여군, $z=1.27$, p for time effect= 0.20 ; 위약대조군 $z=0.23$, p for time effect= 0.81). 시간과 배정군의 상호작용 또한 유의한 차이가 존재하지 않았다 (고용량 투여군, $z=0.83$, p for interaction= 0.41 ; 저용량 투여군, $z=0.75$, p for interaction= 0.45).

복셀기반 형태분석 결과, 전두엽에 위치한 2 개의 군집에서 위약대조군에 비해 발효더덕 추출물 투여군의 회백질 부피가 유의하게 증가한 것으로 관찰되었다: 좌측 중간전두이랑 [(x, y, z) = (-28, 58, 6), cluster size = 1560 mm³, maximum t value = 3.66], 우측 하전두이랑 안와부 [(x, y, z) = (20, 22, -20), cluster size = 1560 mm³, maximum t value = 4.20]. 위약대조군에 비해 발효더덕 추출물 투여군에서 회백질 부피가 감소한 뇌 부위는 관찰되지 않았다.

안전성 평가에서는 8 주간 발효더덕 추출물 복용 이후 유의미한 임상적 차이 또는 중대한 이상반응이 보고되거나 관찰되지 않았다.

결론: 발효더덕 추출물의 경구투여는 동물행동실험과 인체적용시험에서 인지기능 개선 효과를 보였다. 동물행동실험에서는 기억 손상이 억제되었으며, 인체적용시험에서는 주의력 향상 및 전두엽 부위의 회백질 부피 증가가 보고되었다. 인체적용시험에서 작업기억력의 개선 효과는 보이지 않았다. 또한 발효더덕 추출물 경구투여로 인한 이상 반응은 발견되지 않았다. 본 연구는 사람에서 발효더덕 추출물의 인지기능 개선 효과를 처음으로 보고하였으며 기능성 식품으로서 발효더덕의 유효성과 안전성을 확인하였다는 데 의의가 있다.

주요어: 발효더덕, 기능성 식품, 인지기능, 주관적 인지 장애, 주의력, 작업기억력, 복셀기반 형태분석

학번: 2012-20403

목 차

초 록.....	i
목 차.....	v
표 목록.....	vi
그림 목록.....	vii
서 론.....	1
연구 재료 및 방법.....	24
결 과.....	44
고 찰.....	71
참 고 문 헌.....	86
Abstract.....	103

표 목 록

Table 1. Summary of Clinical Trials Examining Effects of Functional Food on Cognitive Improvement	9
Table 2. Studies Examining Effects of Fermented Foods on Brain and Cognitive Function.....	15
Table 3. Studies Examining Neuroprotective Effects of <i>Codonopsis lanceolata</i>	20
Table 4. Characteristics of Study Participants at Baseline.....	50
Table 5. Changes Within and Between Treatment Groups in Adjusted Z-Scores of Attention Domains from Baseline to Week 8	58
Table 6. Changes Within and Between Treatment Groups in Adjusted Z-Scores of Working Memory Domains from Baseline to Week 8	60
Table 7. Summary of Laboratory Monitoring for Safety Assessments Obtained at Each Study Visit	63
Table 8. Summary of Adverse Events Occurring during the Treatment Period	66
Table 9. Detailed Information of Significantly Increased Clusters of Voxel-Based Morphometric Analysis with Fermented <i>Codonopsis lanceolata</i> Treatment	69

그림 목록

Figure 1. Schedule of Animal Behavior Test	26
Figure 2. Schedule of Clinical Study.....	32
Figure 3. Effects of Fermented <i>Codonopsis lanceolata</i> on Scopolamine-Induced Memory Impairment in the Y-maze Test	46
Figure 4. Flow Diagram of Study Participants for Screening, Exclusions, Randomization, and Follow-up	49
Figure 5. Effects of Fermented <i>Codonopsis lanceolata</i> on Attention Performance	56
Figure 6. Effects of Fermented <i>Codonopsis lanceolata</i> on Working Memory Performance	57
Figure 7. Cluster of Significant Group-by-Time Interaction on Gray Matter Volume	70

서론

1. 주관적 인지 장애

1.1 주관적 인지 장애의 임상적 의미

주관적 인지 장애 (subjective cognitive impairment)는 객관적 인지기능 수행은 정상 범주이나 자신의 인지기능이 저하되었다고 주관적으로 호소하는 상태를 말한다 (Stewart, 2012). 주관적 인지 장애는 65세 이상에서 25-56%가 호소하였다는 보고 (Reisberg et al., 2008)가 있을 정도로 고령층에서는 매우 흔하게 보고되는 질환으로서, 초기에는 주로 본인만 불편감을 느끼고 주위 사람들은 눈치 채지 못한다. 증상이 심화되어 가족이나 가까운 사람들이 알아차릴 수 있을 정도로 드러나는 경우는 경도 인지 장애 (mild cognitive impairment)라고 하며, 경도 인지 장애에서 증상에 더 심화된 단계를 치매 (dementia)로 분류한다.

주관적 인지 장애는 종류에 따라서 다양한 증상을 보이며 그 기저 원인은 개인마다 서로 다를 수 있다. 한 가지 원인은 퇴행성 뇌질환의 초기 발현이다. 여러 연구를 통하여 주관적 인지 장애는 경도 인지 장애 및 치매로 진행되기 이전 단계로 여겨지고 있으며, 알츠하이머병 (Alzheimer's disease)의 초기 증상으로 나타날 수 있는 것으로 알려져 있다 (Reisberg et al., 2008; Reisberg et al., 2008). Reisberg 등이 40세 이상의 건강 성인을 대상으로 7년 간 시행한 종적 추적 연구에서,

주관적 인지 장애를 호소한 군은 정상군에 비해 경도 인지 장애나 치매로 발전할 확률이 더 높았으며 객관적인 인지기능 저하도 더 빠르게 진행되었다 (Reisberg et al., 2010). 따라서 주관적 인지 장애는 치매의 위험 요인이며, 주관적 인지 장애군은 인지기능 유지를 위한 예방적 중재에 대한 요구가 큰 집단이라 할 수 있다.

한편 주관적 인지 장애는 퇴행성 뇌질환의 병태생리학적 요인 이외에도 우울, 불안, 스트레스 등 여러 가지 정서적, 심리적 요인으로 인해 발생하는 경우도 있다. Elfgrén 등의 연구에서 주관적 인지 장애군은 치매군 또는 경도 인지 장애군보다 더 높은 우울과 불안을 호소하였고 (Elfgrén et al., 2010), Slavin 등의 연구에서 주관적 인지 장애 정도는 우울, 불안 및 신경증 점수와 상관성이 있었다 (Slavin et al., 2010). 이를 바탕으로 주관적 인지 장애 연구에서는 인지기능 검사뿐만 아니라 우울 및 불안 증상에 대한 평가도 병행되어야 할 것으로 생각된다.

주관적 인지 장애를 포함한 인지기능의 저하는 노화의 진행에 따라 누구나 겪게 되는 현상이며 삶의 질에 큰 영향을 미치는 요소이다. 평균 수명이 증가함에 따라 노년기에도 뇌 기능을 유지할 수 있는 방법에 대한 필요성이 증가하고 있다 (Banerjee et al., 2006). 뿐만 아니라 최근에는 비교적 연령층이 낮은 인구집단에서도 뇌 기능 향상에 대한 관심과 수요가 많으며 (Griffin et al., 2011; Husain et al., 2011), 이를 위한 다양한 중재 방법들이 시도되고 있다. 주관적 인지 장애를 예방 및 개선하기 위한 중재로는 인지 훈련, 운동, 영양 요법 등 여러 가지가 시도되고 있으나, 아직까지 명확한 방법이 확립되지 않았다 (Stewart,

2012).

본 연구에서는 인지기능 저하에 대하여 기능성 식품인 발효더덕 추출물의 경구투여가 예방적 효과 및 개선 효과를 보이는지 평가하고자 하였다. 이를 위하여 먼저 동물에서 발효더덕 추출물의 사전 경구투여가 인지기능 저하를 억제하는지 확인하였다. 또한 주관적 인지 장애군을 대상으로 한 인체적용시험에서 발효더덕 추출물을 경구 복용하였을 때 인지기능 향상 효과가 있는지 평가하였다.

1.2 주관적 인지 장애군의 인지적 특징

인지기능은 기억력, 실행능력, 주의력 등 다양한 세부 영역으로 구성되어 있다. 여러 인지기능 영역 중에서도 치매군과 경도 인지 장애군을 대상으로 한 많은 연구들이 질환의 초기 단계에서 주의력과 작업기억력의 저하를 보고하였다 (Saunders et al., 2010; Rodda et al., 2011).

주의력 (attention)은 여러 자극 중에서 불필요한 것을 무시하고 특정한 자극에 선택적으로 집중하는 인지적 과정을 말한다. 주의력은 뇌의 정보처리과정 중 가장 기본이 되는 단계로서 주의력이 제대로 유지되지 않으면 다른 인지기능도 제대로 발휘될 수 없다. 인지기능을 평가하는 검사는 대부분 부분적으로는 주의력을 반영한다고 볼 수 있으며, 특히 반응시간은 주의력을 직접적으로 반영하는 지표로 생각된다 (Hahn et al., 2002; Vaurio et al., 2009). 또한 주의력은 여러 인지과제의 수행능력과 높은 상관성이 있으며 일반적으로 지능과도 높은 상관을 보이는 것으로 보고되었다 (Cowan et al., 2006).

주의력은 다양하게 정의되고 분류되어 왔는데, 일반적으로 널리 알려진 분류는 선택적 주의력 (selective attention), 분할 주의력 (divided attention), 지속적 주의력 (sustained attention), 그리고 전환 주의력 (switching attention)이다 (McDowd, 2007). 선택적 주의력은 여러 자극 중에서 한 가지 자극에만 주의를 집중하는 능력이고 분할 주의력은 두 가지 이상의 자극에 관심을 적당히 배분하는 능력이다. 지속적 주의력은 한 가지 자극에 지속적으로 관심을 기울이는 능력이고 전환 주의력은 두 가지 이상의 자극에 교대로 주의를 바꾸는 능력이다. 주의력은 뇌 기능 중에서도 고차원적 기능인 실행능력 (executive function)과 밀접하게 연관되어 있다 (Macready et al., 2010). 최근에는 주의력결핍 과잉행동장애 (attention deficit hyperactivity disorder, ADHD)에 대한 관심이 높아지면서 주의력을 향상시키기 위한 중재 방법이 다양하게 연구되고 있다 (Halperin et al., 2011).

작업기억력 (working memory)은 복잡한 인지적 업무를 수행하는 데 요구되는 일시적인 정보의 저장 및 처리와 관련된 단기적인 기억력이다. 모든 실행능력이 작업기억력을 바탕으로 하므로 작업기억력은 인지기능에서 핵심적인 요소이다 (Baddeley, 2012).

가장 잘 알려진 작업기억력 모델은 Baddeley와 Hitch에 의해 제안된 다중성분 모델 (multicomponent model) 이다 (Baddeley, 2000). 이 모델에서 작업기억력은 중앙집행기 (central executive)와 그 하위요소들인 음운고리 (phonological loop), 일화버퍼 (episodic buffer), 시공간그림판 (visuo-spatial scratchpad)로 구성된 시스템이다. 음운고리는 청각적, 음운 정보의 유지와 처리를 담당하고, 일화버퍼는

여러 정보를 결합하여 임시적인 일화 표상 만들기 담당하며,
시공간그림판은 시각적, 공간적 정보의 유지와 처리를 담당한다.
중앙집행기는 과제 요구와 가용 처리자원에 따라서 각 하위요소들에게
적절한 역할을 맡기고 자원을 배정하며 진행 상태를 감시한다. 세 가지
하위요소들은 비교적 독립적으로 작동하므로 병행적으로 처리될 수
있다.

작업기억력 용량은 성인으로 성장할 때까지는 점차 증가하다가
노화가 진행될 수록 감소한다 (Hertzog et al., 2003). 작업기억력은 여러
인지기능 중에서도 노화에 영향을 많이 받는 영역으로서 삶의 질과도
연관되어 있다 (Hedden et al., 2004; Newson et al., 2006). 또한
작업기억력 용량은 필요한 자극을 선택적으로 받아들이고 필요 없는
자극은 무시할 수 있는 능력과 밀접한 연관이 있으므로, 주의력과
작업기억력 간에는 밀접한 상관관계가 있다 (Fukuda et al., 2009).

치매나 경도 인지 장애의 초기 단계에서 주의력과 작업기억력
저하가 주로 보고되는 것을 바탕으로 할 때, 경도 인지 장애군에서도
해당 인지능력 영역이 민감하게 변화할 것으로 예상할 수 있다. 이러한
초기 인지 장애 환자들은 특히 분할 주의력이나 반응 억제 (response
inhibition)와 같이 주의력 자원을 조절하는 기능에 문제가 있는 것으로
알려져 있으며 (Belleville et al., 2007), 주의력 조절 장애는 치매
유전자인 APOE ε4와도 연관이 있는 것으로 보고된 바 있다
(Greenwood et al., 2000). Rodda 등의 기능적 뇌영상 (functional
magnetic resonance imaging, fMRI) 연구에서 경도 인지 장애군은 분할
주의력 측정 과제 수행 시에 치매군과 유사한 뇌 활성화 (좌측

중앙측두엽, 양측 시상, 후대상피질, 미상핵의 활성화 증가)을 보였다 (Rodda et al., 2011).

일련의 선행연구를 바탕으로 할 때 주관적 인지 장애군은 여러 인지기능 중에서도 특히 주의력과 작업기억력에 취약할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 주의력과 작업기억력을 주요 유효성 평가변수로 설정하였다.

2. 기능성 식품의 인지기능 증진 효과

기능성 식품 (functional foods)이란 인체에 유용한 기능성을 가진 특정 원료나 성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법을 통해 제조한 제품을 말한다 (Lee, 2015). 약리적인 변화를 통해 특정 질병을 예방하거나 치료하기 위한 목적으로 사용되는 의약품과 달리, 건강기능식품은 기능성 성분을 이용하여 건강유지 및 증진을 목적으로 한다.

기능성 식품이 가질 수 있는 기능성의 종류는 매우 다양하나 그 중에서 대표적인 것은 인지기능 증진으로서, 최근에는 인지기능을 유지하기 위한 영양 요법 (nutritional therapy)에 대한 관심이 크게 증가함에 따라 관련 연구도 꾸준히 이루어지고 있다 (Wesnes et al., 2000; Kalmijn et al., 2004; Macready et al., 2010). 특히 주관적 인지 장애와 같은 반건강 인구 집단 또는 건강 인구 집단에서 인지기능 저하 예방 및 뇌 기능 향상을 위해 시도할 수 있는 방법 중 기능성 식품 섭취는 비교적 안전성이 확보되어 있으며 접근이 용이한 방법으로 장점을 갖는다고 할 수 있다.

인지기능 증진 효과가 입증된 기능성 식품으로는 은행잎 추출물 (ginkgo biloba), 오렌지주스, 베리, 홍삼, 올리브 오일 등 천연식품과 비타민, 오메가-3, 아연 (Zn) 등의 물질이 있다 (Morley, 2014; Bensalem et al., 2015). 기능성 식품의 종류 따라 그 구성 성분은 다양하겠으나, 대표적으로 항산화 효과를 가지는 파이토케미컬 (phytochemical) 이나 신경세포막의 중요한 구성 성분인 지질을 포함한 식품들이 주로

연구되고 있다. 최근 기능성 식품의 인지기능 증진 효과에 대한 인체적용시험을 표 1에 요약하였다.

인지기능을 증진시키는 기능성 식품의 기전 중 하나로 시냅스 가소성을 조절하는 신경인자인 BDNF (brain-derived neurotrophic factor)를 통한 기전이 알려져 있다. 식품 섭취를 통한 BDNF 증가는 신경가소성에 영향을 주고 뇌 건강 및 정신 건강을 개선시킬 수 있다는 증거들이 보고된 바 있다. 또한 기능성 식품 섭취가 체 내 항산화 물질의 농도나 항산화 효소의 발현을 증가시킴으로써 활성산소종의 유해 효과를 억제하여 신경보호효과를 나타낼 수 있음을 주장하는 연구들도 다수 보고되고 있다 (Dauncey, 2009). 일부 기능성 식품 연구에서는장에서 생성된 호르몬이 뇌로 직접 전달되어 인지기능에 영향을 줄 것이라는 가설을 제시하기도 하였다 (Gómez-Pinilla, 2008). 이와 같이 기능성 식품의 섭취는 다양한 기전을 통하여 뇌 노화를 억제하거나 인지기능을 증진시킬 수 있으며, 특히 반응 시간이나 주의력, 작업기억을 포함한 실행능력, 정신운동 능력 등의 기능을 향상시킬 수 있는 것으로 알려진 바 있다 (Dye et al., 2002).

Table 1. Summary of Clinical Trials Examining Effects of Functional Food on Cognitive Improvement

Authors (Year)	Subject	n	Methods	Results
Jeon et al. (2016)	Elderly individuals with SCI	75	Ganglioside (330 g/day or 660 g/day) vs Placebo (8 weeks)	↑ Working memory ↑ Increases in gray matter volume and functional connectivity in the default mode network
Boespflug et al. (2016)	Elderly individuals with SCI	21	Fish oil (2.4 g/day) vs Placebo (24 weeks)	↑ Working memory ↑ BOLD signal in the posterior cingulate cortex during greater working memory load
Rita Cardoso et al. (2016)	Elderly individuals with MCI	31	Brazil nuts (estimated 288.75 µg/day) vs Placebo (6 months)	↑ Verbal fluency and constructional praxis
Remington et al. (2015)	Elderly individuals with MCI	34	Nutraceutical formulation (folate, alpha-tocopherol, B12, S-adenosyl methionine, N-acetyl cysteine, acetyl-L-carnitine) vs Placebo (6 months)	↑ Cognitive performance (dementia rating scale)

Authors (Year)	Subject	n	Methods	Results
Mastroiacovo et al. (2015)	Healthy elderly individuals	90	Cocoa flavanol-containing drink (993 mg/day, 520 mg/day, or 48 mg/day flavanol) (8 weeks)	↑ Cognitive function (trail making test, verbal fluency test)
Kean et al. (2015)	Healthy elderly individuals	37	High-flavanone (305 mg/day) orange juice vs low-flavanone (37 mg/day) orange-flavored cordial (8 weeks)	↑ Global cognitive function (executive function, episodic memory)
Gavrilova et al. (2014)	Elderly individuals with MCI	160	Ginkgo biloba extract EGb 761 (240 mg/day) vs Placebo (24 weeks)	↓ Neuropsychiatric symptoms ↑ Cognitive performance (trail making test)
Krikorian et al. (2012)	Elderly individuals with MCI	21	Concord grape juice (6.3-7.8 ml/kg/day) vs Placebo (16 weeks)	↓ Intrusion errors during recognition memory task ↑ Activation in anterior and posterior regions of the right hemisphere during working memory task
Park et al. (2011)	Elderly individuals with MCI	91	Green tea extract/l-theanine combination (1680 mg/day) vs Placebo (16 weeks)	↑ Memory and selective attention ↑ Brain theta waves (an indicator of cognitive alertness) in the temporal, frontal, parietal, and occipital areas

Abbreviations: SCI; subjective cognitive impairment, MCI; mild cognitive impairment.

3. 발효더덕 추출물의 신경보호 효과

3.1. 더덕의 임상적 효과 및 유효성분

더덕 (*Codonopsis lanceolata*)은 그 안전성 및 효능이 입증되어 전통의학에서 널리 쓰이는 식물이다 (Hossen et al., 2016). 더덕은 진해 및 거담작용이 있는 것으로 알려져 있으며 면역력 증가 (Ryu, 2008), 항산화 (Hwang et al., 2011) 등의 효능들이 보고된 바 있다. 또한 더덕은 치매 예방 또는 치료 및 인지능 개선용 조성물로 개발되어 특허 등록된 바 있다 (출원번호 10-2011-0080204; 출원번호 10-2010-000114798).

더덕의 주요 유효성분은 플라보노이드 (flavonoid), 탄닌 (tannin) 등을 포함한 폴리페놀 (polyphenol)과 란세마사이드 A (lancemacide A)로 대표되는 사포닌 (saponin)이다 (Hossen et al., 2016).

폴리페놀은 자연에서 합성되는 파이토케미컬로서 과일, 채소 등의 천연 식품에 다량 함유되어 있다. 폴리페놀은 수산기 (hydroxyl group)가 방향고리에 연결되어 있는 구조를 이루고 있는데, 화학적 구조에 따른 극성 정도가 높을수록 혈액뇌장벽 (blood brain barrier, BBB)을 잘 통과하여 뇌로의 전달율이 높아지는 것으로 알려져 있다. 또한 다수의 연구를 통해 폴리페놀의 인지기능 증진 효과와 기전이 잘 알려져 있다 (Vauzour et al., 2010; Vauzour, 2012; Bell et al., 2015). 폴리페놀은 신경세포 및 교세포의 신호전달체계를 통해 신경세포에서 유전자 발현을 조절하고 세포사를 억제한다. 예를 들어 폴리페놀의 일종인 플라보노이드는 p38 or ERK1/2 등의 MAP kinase (mitogen-activated protein kinase) 신호전달체계를 통하여 그 하위 기전에 있는 면역 관련

전사인자인 NF- κ B (nuclear factor-Kappa B)를 조절한다. 그 결과로 중추신경계의 면역 반응을 조절하여 뇌 내의 신경독성 물질을 제거하거나 억제할 수 있다. (Vauzour et al., 2010). 한편 플라보노이드의 섭취는 혈장 NO (nitric oxide) 농도와도 연관이 있는 것으로 알려져 있는데, NO는 신경세포의 생존 및 시냅스 가소성과 밀접한 연관이 있는 인산화 CREB (phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein)의 발현을 조절한다. 플라보노이드에 의해 일시적으로 증가한 NO는 eNOS (endothelial nitric oxide synthase)의 발현과 활성을 증가시키며 이는 혈장 BDNF 증가를 유도하고, 또 NO 자체로 항산화 효과를 통해 신경보호효과를 가지기도 한다 (Bell et al., 2015). 선행 인체적용시험에서 플라보노이드 섭취 1시간 후에 혈장 BDNF의 증가가 보고되었는데, BDNF는 장기강화작용 (long term potentiation, LTP)을 통하여 장기기억을 형성하는 데 관여할 수 있다. 이외에도 폴리페놀의 섭취는 항산화 효소 증가나 사이토카인 분비 등 다방면에 걸친 기전을 통하여 신경보호 효과를 나타내며, 폴리페놀을 섭취한 인체적용시험에서 주의력 및 기억력의 향상이 보고된 바 있다.

더덕의 주요 유효성분으로 잘 알려진 또 다른 물질은 사포닌의 일종인 란세마사이드 A이다. 사포닌은 식물에 널리 분포하는 천연 계면활성물질로서 인체 면역력을 증가시키고 항산화 및 항암효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Rao et al., 2000). 사포닌은 콜레스테롤과 유사한 화학적 구조를 가지므로 콜레스테롤 흡수를 저해하고 배출을 돕는다. 또한 사포닌은 계면활성제로서 작용하기 때문에 세포막에 작은 구멍 (pore)을 형성하여 영양 물질의 흡수를 촉진시키기도 한다 (Johnson et

al., 1986; Francis et al., 2002). 더덕에서 추출된 란세마사이드 A 는 시험관 연구에서 독성 물질인 LPS (lipopolysaccharide)에 의해 유도된 염증반응을 억제하는 것으로 관찰되었고(Joh et al., 2010; Kim et al., 2014), 생쥐에 란세마사이드 A 를 경구투여한 연구에서는 치매 치료제인 도네페질 (donepezil)과 유사하게 기억 손상을 억제하는 것으로 보고되었다 (Jung et al., 2012). 한편 란세마사이드 A 는 장 내 미생물 대사에 의해 에키노시스트산 (echinocystic acid)이라는 화학 물질로 변화하는데, 에키노시스트산은 란세마사이드 A 보다도 더 효과적으로 기억 손상을 개선하는 것으로 알려졌다. 뿐만 아니라 란세마사이드 A 와 에키노시스트산의 경구투여는 BDNF 와 pCREB 발현을 증가시켰다.

이상의 더덕 내에 함유된 폴리페놀과 사포닌의 기능성에 비추어 볼 때, 더덕은 뇌 노화를 억제하고 인지기능을 증진시킬 수 있는 잠재성분으로서 가능성이 기대된다.

3.2. 발효식품의 신경보호 효과에 대한 선행연구

발효는 미생물이 유기물을 분해해서 부산 대사물을 축적하는 현상이다. 식품의 발효는 맛이나 식감뿐만 아니라 생리활성 물질이나 영양구성 등에도 변화를 일으켜 보다 이로운 활성을 발생시키거나 흡수율을 높이는 등 긍정적인 영향을 미칠 수 있는 것으로 알려져 있다 (Wang et al., 2011; Lee et al., 2012).

특히 최근에 주목 받는 장-뇌 축 (Gut-Brain axis) 이론에 따르면 장 내 미생물 환경이 인지기능이나 감정 등을 변화시킬 수 있는 것으로 알려졌다. 장 내 미생물이 없는 무균 (germ-free) 실험동물은

인지기능이나 불안, 우울 등의 정서적 기능이 저하된 행동을 보였으며 이는 후천적인 미생물 접종으로 회복되었다 (Sekirov et al., 2010). 장-뇌 축 이론을 바탕으로, 경구로 섭취하는 음식이 장 내벽을 통해서 뇌의 기능에 영향을 미칠 것으로 예상할 수 있다. 이로운 미생물이 다수 함유되어 있는 발효식품의 섭취는 장 내 미생물 균형을 개선함으로써 인지기능을 비롯한 뇌 기능을 향상시킬 수 있다. 상기에 서술한 Jung 등의 연구에서 란세마사이드 A 보다 장 내 미생물에 의해 변화한 에키노시스트산이 더 효과적인 기억 향상 효과를 보인 것도 같은 맥락으로 해석할 수 있다 (Jung et al., 2012).

발효식품은 세계 각지에서 오래 전부터 다양한 형태로 발달되어 왔다. 특히 아시아권 국가에서는 발효식품이 다른 식품과 차별화된 효능이 있는 것으로 여겨져 그 효능을 과학적으로 입증하기 위한 다수의 연구가 진행되었다. 표 2는 현재까지 보고된 발효식품의 인지기능 증진 효과를 정리한 것이다. 네 건의 임상연구에서 발효식품 섭취 후 뇌 기능과 관련된 생리적, 임상적 개선이 보고되었다. 또한 많은 세포 및 동물실험에서 발효식품 추출물의 처리 후에 세포 생존을 증가, 항산화 효과, 행동학적 기억력 개선 등을 보고하였다.

Table 2. Studies Examining Effects of Fermented Foods on Brain and Cognitive Function

Athors (Year)	Fermented product	Subject	Measurements	Results
<i>Human studies</i>				
Kato-Kataoka et al. (2016)	Fermented milk	Healthy individuals	Physiological parameters in saliva, plasma, and fecal sample, physical symptoms	↓ Salivary cortisol and plasma L-tryptophan ↓ Physical symptoms
Hogervorst et al. (2008)	Tempeh	Healthy elderly individuals	HVLT	↑ Memory
Barbagallo et al. (2013); Barbagallo et al. (2015)	Fermented papaya	Patients with AD	Urinary 8-OHdG	↓ Oxidative stress biomarker
Ng et al. (2008)	Fermented tea	Healthy elderly individuals	MMSE	↓ Risks of cognitive deficiency
<i>In vitro Studies and Animal Studies</i>				
Ano et al. (2015)	Camembert cheese extract	AD model transgenic mice, primary microglia cells	A β deposition, cytokine production, neurotrophic factor	↓ A β accumulation ↓ Hippocampal inflammation

Athors (Year)	Fermented product	Subject	Measurements	Results
				↑ Hippocampal neurotrophic factors
Liu et al. (2016)	Fermented soymilk	PC-12 cells, VaD model rats	Cell viability, MWM	↑ Cell viability in PC-12 cells ↑ Learning and memory of VaD rats
Ohsawa et al. (2015)	Fermented milk	ddY mice	Y-maze, NOR	↑ Memory
Go et al. (2015)	Cheonggukjang extract	ICR mice	PA, NOR, AChE, MDA, SOD, NGF	↓ Memory defects and neuronal cell death ↓ AChE activity ↑ NGF receptor signaling pathway ↓ Oxidative stress
Yoo et al. (2015)	Fermented soybean powder	ICR mice	PA, Y-maze, MWM, AChE	↑ Memory ↓ Hippocampal BDNF reduction ↓ AChE activity
Lee et al. (2007); Lee et al. (2008); Lee et al. (2010)	Red mold rice	IMR32 cells, PC-12 cells, Wistar rats	MWM, PA, Cell viability, MDA, SOD, AChE, iNOS, ROS, Aβ deposition	↓ Aβ-induced neurotoxicity ↓ Memory deficit and Aβ accumulation ↓ β-secretase activity

Athors (Year)	Fermented product	Subject	Measurements	Results
Lee et al. (2009)	Red mold rice	Wistar rats	MWM, PA, antioxidant enzymes, ROS, corticosterone	↑ Memory ↑ Antioxidant activity
Tseng et al. (2016)	Red mold rice	SH-SY5Y cells, SD rats	Cell viability, EBST, ROS, MDA, antioxidant enzymes, NO, TNF- α	↑ Neuroprotective effects
Kanouchi et al. (2016)	Rice vinegar	AD model mice	MWM, antioxidant activity, A β deposition	↑ Cognitive function ↓ A β accumulation
Kim et al. (2013)	Fermented ginseng	AD model HeLa cells, ICR mice, AD model transgenic mice	PA, MWM, A β deposition	↓ A β level ↑ Memory
Hermawati et al. (2015)	Fermented garlic	Wistar rats	MWM, pyramidal neuronal cell number	↑ Pyramidal neurons ↑ Spatial memory
Yang et al. (2012)	Fermented yellow onion	HT22 cells	Antioxidant activity, cell viability	↑ Antioxidative and neuroprotective effect
Zhang et al. (2006); Aruoma et al. (2010)	Fermented papaya	PC-12 cells, AD model SH-SY5Y cells	Cell viability, antioxidant activity, ROS, iNOS, nNOS, SOD, apoptotic proteins	↓ Oxidative stress-induced cell damage ↓ Inflammation ↑ Cell viability and SOD expression

Athors (Year)	Fermented product	Subject	Measurements	Results
Imao et al. (2001)	Fermented papaya preparation	Mice	Spontaneous alternation, PA	↑ Memory
Jung et al. (2012)	Kimchi extract	ICR mice	PA, MWM, Y-maze, BDNF, pCREB	↑ Memory ↑ Hippocampal BDNF and pCREB
Choi et al. (2015)	Fermented Ganoderma luciderm extract	SD rats	PA, MWM, hippocampal AChE	↑ Memory ↓ Hippocampal AChE activity

Abbreviations: 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; AChE, acetylcholinesterase; AD, Alzheimer's disease; ApoE, apolipoprotein E; APP, amyloid precursor protein; A β , β -amyloid; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; EBST, elevated body swing test; FoxP3, forkhead box P3; H₂O₂, hydrogen peroxide; HVLT, Hopkins verbal learning test; iNOS, inducible nitric oxide synthase; IRES, internal ribosome entry site; KA, kanic acid; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MDA, malondialdehyde; MMSE, mini mental state examination; MSG, monosodium glutamate; MWM, Moris water maze; NGF, nerve growth factor; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; NO, nitric oxide; NOR, novel object recognition; OGD, oxygen-glucose deprivation; PA, passive avoidance; pAkt, phosphorylated Akt; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; pCREB, phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein; PD, Parkinson's disease; ROS, reactive oxygen species; SD, Sprague–Dawley; SOD, superoxide dismutase; TNF- α , tumor necrosis factor-alpha.

3.3. 발효더덕의 선행 전임상 연구

증숙 및 발효 공정을 거친 발효더덕은 생 더덕에 비해서 페놀, 플라보노이드 등의 항산화 성분과 항산화 활성이 더 증가되는 것으로 알려져 있다 (Song et al., 2012). 더덕 및 발효더덕의 효과는 세포 및 동물실험에서 확인 되었다 (표 3).

해마유래 세포인 HT22 세포주에 글루타메이트 (glutamate)를 처리하여 세포사를 유도한 후 일반더덕과 발효더덕을 처리하였을 때, 발효더덕 추출물 500 µg/ml 농도에서 세포 생존율이 유의하게 회복한 것으로 나타났다. 발효과정을 거치지 않은 일반더덕에서는 세포보호 효과가 나타난 경우도 있었고 그렇지 않은 경우도 있었다 (Weon et al., 2013; Weon et al., 2013; Weon et al., 2014). 발효더덕 추출물을 처리하였을 때 활성산소와 염증반응 지표 및 세포사와 관련된 지표들은 감소하였고 항산화효소 및 항산화 물질은 증가하였다.

발효더덕 추출물을 생쥐에게 경구투여한 후 실시한 동물실험에서는 Morris 수중미로실험과 수동회피실험으로 기억력 향상이 확인되었으며 (He et al., 2011; Weon et al., 2013; Weon et al., 2013) 해마에서 BDNF와 phosphorylated CREB 이 증가한 것으로 보고되었다 (Weon et al., 2014).

이와 같이 발효더덕은 항산화 효과 및 신경보호기능을 가진 잠재적 성분으로 관심을 받고 있으나 아직까지 사람을 대상으로 인지기능 증진 효과에 대한 중재 연구가 진행된 바가 없으므로, 본 연구에서는 발효더덕 추출물의 인체에서의 뇌 기능 개선 효과를 평가하고자 하였다.

Table 3. Studies Examining Neuroprotective Effects of *Codonopsis lanceolata*

Authors (Year)	Subject	Methods	Results
<i>In vitro Studies</i>			
Weon et al. (2013)	HT22 cells	Control vs SCO vs DON vs CL (10, 100, 500 µg/ml) vs FCL (10, 100, 500 µg/ml)	↑ Cell viability in FCL (500 µg/ml)
(Weon et al. (2013)	HT22 cells	Control vs SCO vs DON vs CL (10, 100, 500 µg/ml) vs FCL (10, 100, 500 µg/ml)	↑ Cell viability in CL (500 µg/ml), FCL (500 µg/ml)
Weon et al. (2014)	HT22 cells	Control vs FCL (10, 100, 500 µg/ml) vs Trolox	↑ Cell viability in FCL (500 µg/ml) ↓ ROS in FCL (500 µg/ml) ↓ Ca ²⁺ influx in FCL (100, 500 µg/ml) ↓ NO in FCL (10, 100, 500 µg/ml) ↑ Glutathione in FCL (500 µg/ml) ↑ Glutathione reductase in FCL (500 µg/ml) ↓ Bax in FCL (100, 500 µg/ml) ↓ Caspase-3 in FCL (10, 100, 500 µg/ml)

Authors (Year)	Subject	Methods	Results
Animal Studies			
Weon et al. (2013)	Mice, male	Sham vs SCO vs DON vs CL (100, 300 mg/kg) vs FCL (100, 300 mg/kg)	↑ Memory in FCL (300 mg/kg) : MWM ↑ Memory in FCL (100, 300 mg/kg) : PA
Weon et al. (2013)	Mice, male	Sham vs SCO vs DON vs CL (100, 300, 500 mg/kg) vs FCL (100, 300, 500 mg/kg)	↑ Memory in FCL (500 mg/kg) : MWM ↑ Memory in FCL (300, 500 mg/kg) : PA
He et al. (2011)	Mice, male	Sham vs SCO vs CL vs FCL	↑ Memory in FCL: PA
Weon et al. (2014)	Mice, male	Sham vs SCO vs DON vs FCL (300, 500, 800 mg/kg)	↑ Memory in FCL (500, 800 mg/kg): MWM ↑ Memory in FCL (800 mg/kg): PA ↑ hippocampal BDNF expression in FCL (300, 500, 800 mg/kg) ↑ hippocampal pCREB expression in FCL (800 mg/kg)

Abbreviations: CL, *Codonopsis lanceolata*; FCL, Fermented *Codonopsis lanceolata*; SCO, scopolamine; DON, donepezil; PA, passive avoidance; MWM, Morris water maze; BDNF, brain-derived neurotrophic factor ; pCREB, phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein; ROS, reactive oxygen species; NO, nitric oxide.

4. 연구 목적 및 가설

기존의 연구를 종합하면 발효더덕 추출물은 항산화 효과를 통하여 활성산소의 산화 스트레스로부터 신경세포를 보호할 수 있음이 세포실험 및 동물실험을 통해서 꾸준히 보고되었다. 이를 바탕으로 발효더덕 추출물이 뇌 노화를 억제하여 인지기능 저하를 예방하고 뇌 기능을 개선할 가능성을 유추할 수 있으나, 아직까지 사람을 대상으로 그 효과를 탐구한 연구는 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 동물행동실험 및 인체적용시험을 통하여 발효더덕 추출물의 경구투여가 갖는 인지기능 저하 예방 및 뇌 기능 개선 효과를 평가하고자 한다.

발효더덕 추출물의 효과를 확인하기 위하여 동물행동실험에서는 사전 경구투여 후 인지기능 손상을 유도하는 예방적 실험을 수행하였다. ICR 생쥐에서 발효더덕 추출물 또는 증류수를 2주간 사전 경구투여한 후 중추신경계의 아세틸콜린 작용을 억제하는 스코폴라민을 복강투여함으로써 기억 손상을 유도하였다. 그 후 Y-미로 실험을 실시하였으며 인지기능은 변경행동력 (spontaneous alteration)으로 평가하였다. 본 연구에서는 기존 동물연구들이 발효더덕 추출물을 단 회로 투여한 후 실험한 것과 차별화하여 2주간의 비교적 장기 투여에 따른 인지기능 저하 예방효과를 평가하였다.

인체적용시험에서는 인지기능 손상을 유도하는 실험을 수행하기 어려우므로, 치매 위험군으로 여겨지면서 예방적 중재를 통해 인지기능 저하 예방 및 개선을 기대할 수 있는 주관적 인지 장애군을 대상으로 발효더덕 추출물의 인지기능 개선 효과를 연구하였다. 인체적용시험은

만 20 세에서 65 세 사이의 주관적 인지기능 저하를 호소하는 반건강인 성인 남녀를 대상으로 하였고, 8 주간 무작위, 이중맹검, 위약-대조 인체적용시험을 시행하였다.

인체적용시험에서 주 가설의 내용은 8 주간 발효더덕 추출물을 섭취한 군이 위약대조군에 비해 인지기능이 향상된다는 것이다. 인지기능 영역 중에서도 주관적 인지 장애에서 특징적인 저하 도메인인 주의력과 작업기억력을 유효성 평가변수로 정하였다. 기저시점과 8 주차에 신경심리검사를 통해 주의력과 작업기억력에 관련된 지표를 획득하고, 이를 시간에 따른 차이와 군에 따른 변화 정도의 차이가 있는지 비교 분석하였다. 발효더덕 추출물의 안전성을 평가하기 위한 안전성 평가변수는 혈액검사, 소변검사 및 자가보고 부작용 평가를 통하여 기저시점, 4 주차 및 8 주차에 획득하였다. 아울러 추가적인 탐색 분석으로 8 주간 경구투여 이후 뇌 내 회백질 부피의 군 간 차이가 있는지 비교하였다. 이를 평가하기 위한 탐색적 평가변수로서 구조적 뇌 자기공명영상에 대한 복셀기반 형태분석을 수행하고 군 간 회백질 부피의 변화에 차이가 있는지 분석하였다.

연구 재료 및 방법

1. 동물행동실험

1.1. 실험동물 및 사양

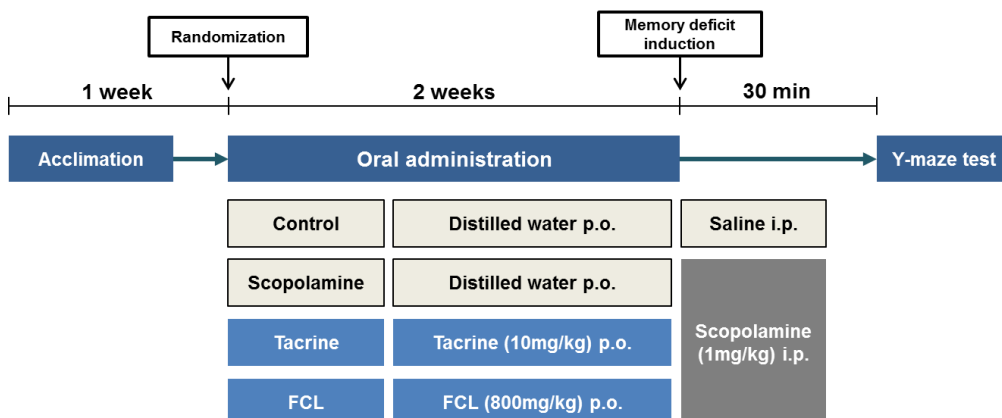
체중이 25-30g 인 4 주령 ICR 생쥐 수컷을 (주)오리엔트바이오 (Orient Bio Inc., 성남, 한국)에서 구입하였다. 사육상자 당 4-5 마리씩 배정하였으며 온도 22°C, 습도 50%, 12 시간의 명암 주기를 유지하도록 설정되어 있는 SPF 사육실에서 사육 및 실험을 진행하였다. 처음 반입된 실험동물은 본 실험에 앞서 일주일의 적응기간을 거쳤다. 적응기간 및 실험기간 동안 물과 사료섭취는 제한하지 않고 공급하였다.

스코폴라민 (scopolamine)은 아세틸콜린 작용을 억제함으로써 기억 손상을 유도하는 물질이며, 타크린 (tacrine)은 아세틸콜린 분해를 억제하여 치매 치료제로 사용되는 물질이다. 실험동물의 기억 손상을 유도하기 위하여 스코폴라민을 복강주사로 투여하였으며 양성대조군에서는 기억 회복을 유도하기 위해서 타크린을 경구투여하였다. 스코폴라민과 타크린은 시그마알드리치 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)에서 구입하였다. 동물실험용 발효더덕 추출물은 뉴트리 (Newtree, 성남, 한국)에서 공급받았다.

1.2. 투여 일정 및 방법

일주일의 적응기간 후 실험동물은 임의로 실험군에 배정되었다. 실험군은 정상대조군, 스코폴라민 투여군, 타크린 투여군, 발효더덕 추출물 투여군의 4 군으로 각 군당 10 마리씩 구성하였다. 실험군에 배정된 직후부터 2 주 동안 1 일 1 회씩 정상대조군과 스코폴라민 투여군에는 증류수를, 타크린 투여군에는 10 mg/kg body weight 의 농도로 증류수에 용해한 타크린을, 발효더덕 추출물 투여군에는 800 mg/kg body weight 의 농도로 증류수에 혼합한 발효더덕 추출물을 존대를 이용하여 경구투여 하였다. 2 주 후에 마지막 경구투여를 한 후 1 시간 뒤, 정상대조군을 제외한 스코폴라민 투여군, 타크린 투여군, 발효더덕 추출물 투여군에 2 mg/kg body weight 의 스코폴라민을 복강주사로 투여하여 기억 손상을 유도하였다. 정상대조군에는 같은 양의 생리식염수를 복강주사로 투여하였다. 스코폴라민 및 생리식염수 투여 30 분 후에 Y-미로 실험을 실시하였다 (그림 1).

Figure 1. Schedule of Animal Behavior Test



For the animal study, ICR male mice were orally administered with distilled water, tacrine (10 mg/kg body weight), or fermented *Codonopsis lanceolata* (800 mg/kg body weight) for 2 weeks after a 1-week adaptation period. Two weeks later, memory deficit was induced by scopolamine 30 minutes prior to testing. Cognitive function was evaluated with spontaneous alternation in the Y-maze test.

Abbreviations: FCL, Fermented *Codonopsis lanceolata*; p.o., oral administration (per os); i.p., Intraperitoneal.

1.3. Y-미로 실험

Y-미로 실험은 공간지각능력 및 단기 기억력을 측정하는 실험으로서 스코폴라민 투여 후 Y-미로 실험실시는 동물에서의 인지기능 개선 효과를 확인하기 위해 널리 이용되는 방법이다. Y-미로 실험 기구는 3 개의 가지로 구성되어 있으며 각 가지의 길이는 30 cm, 넓이는 6 cm, 높이는 15 cm 이고 세 가지는 서로 120°의 각도로 배치되었다. 각 가지를 A, B, C 영역으로 정한 후 한쪽 가지의 가장자리 끝에 실험동물을 조심스럽게 놓고 8 분동안 자유롭게 움직이게 한 다음 움직인 경로를 상단에 설치한 카메라를 통하여 기록하였다. Y-미로는 암막 커튼이 쳐진 암실 내 위치하여 실험동물이 소리, 조명, 실험자에 의해 받을 수 있는 영향을 차단하였다. 암실 내부의 벽에는 실험동물이 위치 단서로 인식할 수 있는 표지를 부착하였다.

실험이 종료된 후 영상을 판독하여 실험동물이 입장한 영역의 순서와 전체 입장 횟수를 측정하였다. 몸통이 영역 안으로 완전히 들어갔을 경우를 한 영역에 입장한 것으로 하였으며 세 개의 서로 다른 가지에 차례로 들어간 경우를 실제변경 (actual alternation)으로 정의하고 1 점을 부여하였다. 전체 입장 대비 실제변경의 비율이 변경행동력 (spontaneous alteration)이며, 다음의 수식으로 계산하였다.

변경행동력 (%)

$$= (\text{실제변경 (actual alternation) 수} / \text{총 입장 횟수} - 2) \times 100$$

1.4. 통계 분석

통계 분석은 Stata 13.1 (StataCorp, TX, USA)를 사용하였다. 실험군 간 변경행동력과 총 입장 횟수의 차이를 비교하기 위하여 일원배치 분산분석 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA)을 수행하였으며, 사후검정으로 Scheffe 의 다중비교분석을 실시하였다. 유의확률이 0.05 미만인 경우 군 간 차이가 있는 것으로 판단하였다.

2. 인체적용시험

2.1. 연구 대상자

연구 대상자는 광고문을 통하여 모집하였다. 광고문을 보고 연락한 대상자는 일차적으로 전화 선별을 거쳤으며 전화 선별 대상 중 연구참여를 원하는 경우 방문 선별 검사를 진행하였다. 모든 연구 대상자는 방문 선별 검사 시작에 앞서 연구의 특징, 목적, 과정, 잠재적 위험요소 및 이득에 대한 충분한 설명을 들었으며, 연구 대상자가 직접 서면 동의서에 서명을 한 이후에 연구 과정이 시작되었다. 모든 연구 과정은 이화여자대학교 생명윤리심의위원회의 심의 및 승인 하에 진행되었다.

선정 기준은 다음과 같았다. 1) 만 20 세-65 세 사이의 성인 남녀; 2) 고등학교 졸업 이상; 3) GDS 로 평가하였을 때 2 에 해당하는 경우 (주관적 인지기능 저하에 대한 호소가 있으나, 객관적으로 인지기능 저하를 보이지 않는 경우). 제외 기준은 다음과 같았다. 1) 심각한 주요 신체질환 및 신경과적 질환이 있는 경우; 2) DSM-IV-TR 에 기반한 구조화된 정신과적 면담(SCID-IV)을 실시한 결과 제 1 축 정신장애가 있는 경우; 3) MMSE-KC 25 점 이하 또는 CDR 0.5 점 이상으로 임상적인 치매 진단이 의심되는 경우; 4) K-WAIS 로 평가하였을 때, 지능지수가 70 미만인 경우; 5) 의식 소실 혹은 경련을 동반한 두부 외상의 병력이 있는 경우; 6) 항정신성약물을 연구 참여 시점부터 3 개월 이전 동안 어느 때라도 복용한 적이 있는 경우; 7) 더덕 혹은 더덕을 포함한 식품에 부작용 혹은 알레르기 반응이 있었던 경우; 8) 본 인체시험에 영향을 줄

수 있는 기간 내에 다른 약물을 복용하거나 다른 인체적용시험에 참여하였던 경험이 있는 경우; 9) 피임약을 복용중인 경우; 10) 연구 참여 기간 중 임신을 계획하고 있거나, 현재 임신 중 혹은 수유 중인 경우.

선별 검사에서 선정 기준을 평가하여 적합 여부가 판단되면 최종적인 연구 대상자가 되었다.

2.2. 발효더덕 추출물 시험약 및 위약 정보

발효더덕 추출물 시험약은 건강기능식품 회사인 뉴트리 (Newtree, 성남, 한국)에서 공급받았다. 시험약의 제작은 더덕의 증숙, 유산균 (*Bifidobacterium longums*, *Lactobacillus acidophilus*)을 이용한 발효, 주정 추출, 여과, 농축 과정으로 얻은 발효더덕 추출물을 텍스트린과 혼합한 후에 살균 및 분무과정을 거쳐 제조되었다. 발효더덕 추출물은 잔류농약, 미생물, 중금속 검사에서 모두 음성 및 안전범위로 평가 받았다. 고용량 투여군에서 사용된 1500 mg 알약에는 발효더덕 추출물이 1050 mg 함유되었고 저용량 투여군에서 사용된 750 mg 알약에는 발효더덕 추출물이 525 mg 함유되었다. 위약은 맛, 색깔, 냄새, 용량 등이 모두 실약과 동일하게 제조되었다.

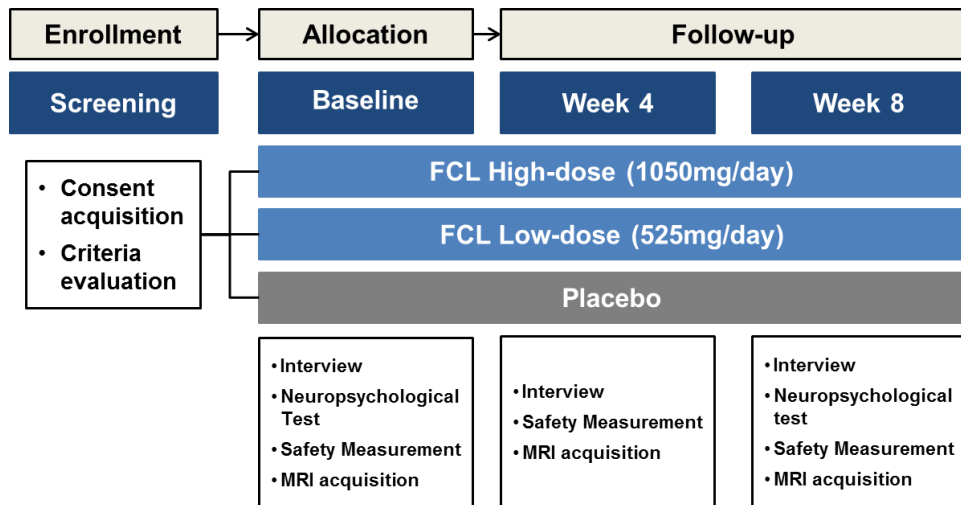
2.3. 연구 디자인 및 방법

본 연구는 무작위, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험이다. 선별 검사 후에 최종적으로 연구 참여가 결정된 연구 대상자는 발효더덕 추출물 고용량 투여군 (1050 mg/day, n=20), 발효더덕 추출물 저용량 투여군 (525 mg/day, n=20), 또는 위약대조군 (n=20)에 무작위로 배정되었다.

연구 대상자들은 기저시점 방문 시부터 총 8주간 하루에 1회 발효더덕 추출물 또는 위약을 경구복용 하였으며 4주차 및 8주차에 방문하여 추적 검사를 수행하였다. 인지기능 측정을 위한 신경인지기능 검사와 뇌 자기공명영상 획득은 기저시점과 8주차에 시행되었다. 또한 주관적 인지기능 저하에 영향을 미칠 수 있는 우울 및 불안 증상에 대한 검사도 기저시점과 8주차에 시행되었다. 안전성 평가를 위한 종합 혈액검사 및 소변검사는 기저시점과 4주차, 8주차에 시행되었다 (그림 2).

연구 참여기간 동안 다른 건강보조식품이나 중추신경계에 영향을 줄 수 있는 병용요법은 허용되지 않았다. 다만 감기, 두통, 소화불량 등 경증 신체 증상으로 급성 약물 투여가 필요한 경우 7일 이내로 허용하였다. 또한 연구 대상자는 직접 투약일지를 작성하도록 지급받았으며 4주차 및 8주차에 잔약과 함께 반납하도록 지시받았다. 복용 순응도는 투약일지 기록 내용과 잔약의 개수를 통해 모니터링하였다.

Figure 2. Schedule of Clinical Study



In the clinical trial, a total of 60 individuals participated in a randomized, double-blind, placebo-controlled 8-week trial. Participants were allocated to either the fermented *Codonopsis lanceolata* groups (high-dose: 1050 mg/day, n=20 or low-dose: 525 mg/day, n=20) or the placebo group (n=20) at the baseline visit. The primary outcome measures were the attention composite z-score and working memory composite z-score, which were calculated based on performance in a series of cognitive tasks including letter-number sequencing, digit span, and several tests from the Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB). Cognitive tasks and clinical interviews were conducted at Baseline and Week 8. Laboratory monitoring and adverse event rating for safety assessment was conducted at Baseline, Week 4, and Week 8. Also, as an exploratory outcome, changes in gray matter volume were assessed by voxel-based morphometry of high-resolution T1-weighted magnetic resonance images.

Abbreviations: FCL, Fermented *Codonopsis lanceolata*.

2.4. 연구 표본 수 및 산출 근거

본 연구의 목표 연구 대상자의 수는 발효더덕 추출물 고용량 투여군 20 명, 발효더덕 추출물 저용량 투여군 20 명, 위약대조군 20 명이였다. 정상 인구집단에서 발효더덕 추출물의 인지기능 증진 효과에 대해 보고한 선행 문헌은 아직 없으므로, 천연물 유래 건강기능식품의 인지기능 개선을 보고한 선행연구의 결과를 토대로 본 연구의 목표 연구 대상자 수를 산출하였다.

더덕과 유사한 뿌리식물인 인삼의 인지기능 개선 효과는 비교적 많이 연구된 주제이다. 건강한 성인을 대상으로 8 일 간의 인삼 복용 후 작업기억력의 호전을 비교한 연구에서 (Reay et al., 2010) 위약대조군, 인삼 200mg 복용군, 인삼 400mg 복용군의 향상 점수는 각각 0.02 (표준편차 0.20), -0.05 (표준편차 0.20), 0.17 (표준편차 0.24)점이였다. 이를 토대로 표본 수를 산출한 결과 알파 값 0.05 에서 ANOVA F-test 가 0.8 의 검정력을 달성하기 위해 필요한 연구 대상자 수는 각 군에서 17 명 이상으로 산정되였다. 추적관찰 중 다양한 변수에 의한 중도 탈락율을 15%로 고려하고 계산하여 각 배정군의 표본 수를 20 명으로 정하였다.

2.5. 인지기능 평가 : 주의력 및 작업기억력

유효성 평가변수인 주의력과 작업기억력은 기저시점 및 8 주차에 인지기능 검사를 통하여 평가하였다. 인지기능 검사는 Saunders 등의 연구를 비롯한 여러 기능성 식품의 인지기능 증진 효과 연구에서 사용된 측정 도구를 참고하여 (Macready et al., 2010; Saunders et al., 2010),

기존의 신경심리검사집에서 주의력 또는 작업기억력을 평가할 수 있는 소검사를 선정하여 시행하였다.

2.5.1. 주의력 평가 척도

주의력 평가 척도로 선정된 소검사 항목들은 한국판 웨슬러 성인 지능 검사 III (Korean-Wechsler Adult Intelligence Scale III)의 일부인 글자-숫자 나열하기 (letter-number sequencing, LNS), 숫자 바로 외우기 (digit span forward)와 전산화 캠브리지 신경인지검사법 (Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery, CANTAB)의 일부인 match to sample visual search (MTS), reaction time (RTI), rapid visual information processing (RVP), stop signal task (SST)였다.

글자-숫자 나열하기와 숫자 바로 외우기는 주의력 및 작업기억력을 반영하는 소검사이다 (Wechsler D, 1997). 글자-숫자 나열하기 검사는 연속되는 요일과 숫자의 혼합 목록을 불러준 후 요일과 숫자 각각을 순서대로 외워서 말하도록 하는 과제로 총 10 문항에서 정확하게 반응한 경우 점수를 주어 합산한다. 요일과 숫자를 따로 기억하고 머릿속에서 처리해야 하므로 분할 주의력, 청각적 단기 기억력, 정신적 조작능력 등을 요하며, 점수가 높을수록 주의력이 높은 것으로 판단할 수 있다. 숫자 바로 외우기 검사는 일련의 숫자를 불러준 후 바로 따라서 순서대로 외워서 말하도록 하는 과제이다 (Ryan et al., 1996; GrÉGoire et al., 1997). 3 개의 숫자 목록에서 시작하여 점점 숫자 개수가 늘어나며 연구 대상자가 기억한 숫자 개수의 최대값이 숫자 폭 (digit span)이 된다. 숫자 폭이 클수록 높은 주의력을 나타낸다.

CANTAB 은 전산화된 신경심리검사집으로서 컴퓨터와 연결된 버튼장치 및 터치 스크린을 이용하여 응답하면 자동으로 측정치가 입력되는 검사이다 (Fray et al., 1996). 본 연구에서는 주의력과 관련이 있는 MTS, RTI, RVP, SST 검사를 시행하였으며 검사는 CANTAB 에서 제공하는 표준화된 방법을 따라서 수행되었다.

MTS 검사는 불필요한 자극을 무시하고 목표 시각 자극을 찾는 과제로서 선택적 주의력을 요한다. 연구 대상자는 버튼장치를 누른 채 화면을 보면서 과제를 시작한다. 먼저 가운데에 목표 시각 자극인 추상도형이 나타나고, 이어서 주변에 유사하게 생긴 몇 개의 추상도형이 나타난다. 버튼장치를 누르면서 화면을 보고 있다가 목표 시각 자극과 동일한 것을 찾으면 버튼장치에서 손을 떼고 화면을 터치하여 선택한다. 전체 시각 자극이 제시되어 정반응을 한 후 다시 버튼장치를 누르기까지 걸린 시간을 평균 정반응시간 (mean correct reaction time)로 정의하며 평균 정반응시간이 짧을수록 주의력이 높다.

RTI 는 분할 주의력 및 지속적 주의력을 측정하는 검사이다. 연구 대상자는 버튼장치 누르고 있다가 화면의 비어있는 원 안에 노란색 원이 나타나는 순간 바로 버튼에서 손을 떼고 동일한 손가락으로 화면을 터치한 후 다시 버튼장치를 누른다. RTI 는 단일 패러다임과 5 지선택 패러다임이 있으며, 단일 패러다임을 먼저 한 후 5 지선택 패러다임을 시행하였다. 평균 반응 시간 (mean simple reaction time, mean five-choice reaction time) 은 노란색 원이 제시된 후부터 버튼에서 손을 떼기까지 걸린 시간으로서 반응시간이 짧을수록 주의력이 높음을 의미한다.

RVP 는 한 대상에 주의력을 계속해서 주는 지속적 주의력을 평가하는 검사이다. 과제가 시작되면 화면에 흰색 테두리의 박스 하나가 나타나고 그 안에 한자리 숫자가 나타나며 그 숫자는 무작위적으로 계속해서 바뀐다. 연구 대상자는 버튼장치에 손가락을 올려서 누를 준비를 하고 숫자의 변화를 응시하다가 특정한 3 자리 순서의 숫자 (예: 2-4-6, 3-5-7 등)가 나타나면 바로 버튼을 한 번 누른다. 과제를 수행하기 위해서는 화면에 주어지는 숫자에 지속적으로 집중을 하고 있어야 한다. 평균 응답시간 (mean latency)은 정반응을 한 경우 반응시간 평균을 나타낸 것이며 평균 응답시간이 짧을수록 주의력이 높다. RVP 의 응답시간은 지속적 주의력을 잘 설명하는 지표로서 니코틴 중재에 따른 변화를 감지할 정도로 민감한 지표로 알려져 있다 (Sahakian et al., 1989).

SST 는 실행 기능의 핵심 요소인 반응 억제 및 주의력을 측정하는 과제이다 (Logan et al., 1984). 과제 시작 전에 버튼장치의 두 개 버튼 위에 각각 왼쪽과 오른쪽 검지를 올려놓은 상태에서 진행되며, 과제가 시작하면 화면에 왼쪽 또는 오른쪽을 가리키는 화살표가 나타나고 연구 대상자는 최대한 빨리 화살표 방향에 해당되는 방향을 눌러야 한다. 검사 문항 중 일부에서는 화살표가 화면에 나타난 후 정지 신호가 청각적으로 주어지며, 이 때에는 버튼을 누르지 않고 멈추어야 한다. 정지-신호 반응 속도(stop-signal reaction time)는 반응을 멈추기 위해서 필요한 시간을 뜻하며, 이 반응속도가 짧을수록 인지 조절 및 반응 제어(response control)가 잘 되는 것을 의미한다.

주의력을 반영하는 위의 일곱 가지 검사 점수를 조합하여 하나의 주의력 복합 Z 점수로 계산하고 이를 반응변수로 하여 통계 분석을 수행하였다. 복합 Z 점수를 계산하기 위하여 우선 연구대상의 개별 인지기능 검사 점수를 의존변수로 넣고, 나이, 성별, 지능지수 (intelligent quotient, IQ), 기저시점의 수행 점수를 설명요인으로 넣은 선형회귀모형에서 잔차 (residual)를 구하여 나이, 성별, 지능지수에 의한 영향을 보정하였다. 각 검사의 잔차는 위약대조군의 0 주 및 8 주차의 합동표준편차 (pooled SD)로 나누어 잔차 Z 점수로 전환하였다. 이 때 잔차 Z 점수의 부호는 양의 방향이 주의력이 증가하는 것을 의미하도록 하였다. 일곱 가지 개별 검사의 표준화된 잔차 Z 점수를 구한 이후에 이들의 평균을 구하여 주의력 도메인에 대한 하나의 복합 Z 점수 (composite score)를 최종적으로 구하고 이를 주의력 측정을 위한 평가변수로 사용하였다.

2.5.2. 작업기억력 평가 척도

작업기억력 평가를 위해서는 한국판 웨슬러 성인 지능 검사 III의 숫자 거꾸로 외우기 (digit span backward)와 CANTAB의 spatial working memory (SWM), spatial span (SSP)을 선정하였다.

숫자 거꾸로 외우기 검사는 일련의 숫자를 불러준 후 반대 순서대로 외워서 말하도록 하는 과제이다 (Ryan et al., 1996; GrÉGoire et al., 1997). 이 검사는 청각적 단기 기억력을 요하는 과제로서 다수의 기능성 식품 연구에서 작업기억력을 측정하기 위한 지표로 사용되었다.

SWM은 공간 작업기억력을 평가하는 인지기능 검사이다. 연구 대상자는 화면의 여러 개의 가려진 상자를 눌러서 토큰이 숨겨져 있는 위치를 맞추어야 한다. 상자를 눌렀을 때 토큰이 없었던 상자 또는 이미 토큰을 찾았던 상자의 위치는 계속해서 업데이트하고 기억해야 한다. 각 시행에서 이미 눌러 본 상자는 피해서 위치를 찾아야 하며, 과제를 성공할 때마다 상자의 개수가 늘어나서 필요한 작업기억력 폭이 증가한다. **SWM** 검사는 전체 오류의 개수 (**total errors**)로 수행 정도를 평가한다.

SSP는 시공간 작업기억력 폭을 측정하는 검사로서 **Corsi Block** 과제의 컴퓨터 버전이다. 검사가 시작되면 10 개의 흰 박스가 화면에 나타나며 그 중 일부의 색깔이 차례대로 3 초 동안 바뀌었다가 흰색으로 돌아온다. 연구 대상자는 색이 변하였던 박스를 같은 순서 또는 역순으로 눌러야 한다. 과제에 성공할 때마다 기억해야 하는 박스의 개수가 늘어나며, 연구 대상자가 여러 번 실패할 경우에는 검사가 종료된다. 연구 대상자가 성공적으로 순서를 기억한 최대 박스 개수가 시공간 폭 (**visuospatial span**)이 된다.

작업기억력을 반영하는 세 가지 검사 점수를 이용하여 주의력 복합 **Z** 점수와 동일한 방법으로 작업기억력 복합 **Z** 점수를 계산하였고 이를 작업기억력 측정을 위한 평가변수로 사용하였다.

2.6. 안전성 평가 및 우울, 불안 평가

발효더덕 추출물의 안전성을 지속적으로 모니터링하기 위하여 안전성 평가변수는 기저시점, 4 주차 및 8 주차에 획득하였다. 활력

징후와 체질량 지수를 측정하고 종합혈액검사와 소변검사 등 실험실적 검사를 시행하여 정상 참고치에서 벗어나지 않는지 이상 여부를 확인하였다. 또한 이상반응 여부는 Udvalg for Kliniske Undersogelser (UKU) Side Effect Rating Scale 을 이용한 면담에서 연구 대상자의 보고를 통해서도 평가되었다 (Lingjærde et al., 1987).

연구 대상자의 우울 및 불안 증상은 기저시점 및 8 주차에 면담을 통하여 평가하였다. 우울 증상은 해밀턴 우울 척도(Hamilton Depression Rating Scale, HDRS)로 평가하였다 (Hamilton, 1960). 해밀턴 우울 척도는 우울 증상 평가를 위하여 개발된 반구조화된 면담 도구로서 총 17 개의 문항으로 이루어져 있다. 총점의 범위는 0-52 점으로 점수가 높을수록 우울 증상이 심한 것을 의미한다. 불안 증상은 해밀턴 불안 척도 (Hamilton Anxiety Rating Scale, HARS)로 평가하였다 (Hamilton, 1959). 해밀턴 불안 척도는 반구조화된 면담을 통하여 불안 정도를 임상적으로 평가하는 도구로서 총 14 개의 문항으로 이루어져 있다. 총점의 범위는 0-56 점으로 점수가 높을수록 불안 증상이 심한 것을 의미한다.

2.7. 뇌 자기공명영상 획득 및 복셀기반 형태분석

뇌 자기공명영상은 3.0 Tesla Philips Achieva MR scanner (Philips Medical System, Netherlands)에서 획득하였다. 뇌 자기공명영상 분석을 위하여 32 채널 headcoil 을 이용하여 고해상도 T1 강조 (T1- weighted) 영상을 얻었으며, 영상 획득에 사용된 파라미터는 다음과 같다: 180 장의 연속적인 시상 단면, slice thickness = 1 mm, repetition time (TR) = 7.4 ms,

echo time (TE) = 3.4 ms, flip angle (FA) = 8°, field of view (FOV) = 220 X 220 mm², number of excitation (NEX) = 1.

뇌 내 이상 여부를 확인하기 위해서는 proton density/T2 강조 영상과 FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery) 영상을 획득하고 배경균에 대한 정보가 없는 영상의학과 전문의(L.S.M)에게 판독을 의뢰하여 해부학적 이상 여부를 검토하였다. Proton density/T2 강조 영상은 axial 로 획득하였으며 영상 획득에 사용한 파라미터는 다음과 같다: TR = 3000 ms, TE = 9.5/90 ms, FA = 90°, FOV = 202 X 201 mm², slice thickness = 2.5 mm, NEX = 1. FLAIR 영상은 시상면 방향으로 획득하였고 영상 획득에 사용한 파라미터는 다음과 같다: TR = 8000 ms, TE = 332 ms, inversion time = 2400 ms, FA = 90°, FOV = 250 X 250 mm², slice thickness = 0.6 mm, NEX = 1.

획득한 T1 강조 영상에서 회백질 부피 변화를 평가하기 위하여 FMRIB's Software Library (FSL)에 내장되어 있는 복셀기반 형태분석 (voxel-based morphometry, VBM; <http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/FSLVB>)을 적용하였다 (Ashburner et al., 2000).

먼저 T1 강조 영상에서 BET (brain extraction tool) 기능을 이용하여 뇌실질이 아닌 조직을 제거하고, FMRIB's Automated Segmentation Tool (FAST) 기능을 이용하여 뇌 조직을 회백질, 백질 및 뇌척수액으로 분할 (segmentation) 하여 각 조직 유형만 남겨둔 영상을 얻었다. 이 중에서 회백질만 분리한 영상을 모아 원공간 위치 (native space)에 있던 영상을 표준 공간인 Montreal Neurological Institute (MNI) 위치로 정렬하고 공간정규화 (spatial normalization)를 한 이후에 모든 영상의 평균 영상을

구하였다. 이 평균 영상과 좌우가 바뀐 영상을 다시 평균 내어 연구에 특이적인 템플릿 (study-specific template)을 제작하였다. 템플릿 제작에는 각 배정군에서 동일한 수의 영상이 사용되었다. 이후 원공간 위치에 있는 각 연구 대상자들의 영상을 템플릿에 비선형 변환 (nonlinear transformation)으로 공간 정규화를 하여 모든 영상이 동일한 표준 공간 (standard space)에 위치하도록 하였다. 공간 등록을 할 때에는 Jacobian 결정인자를 곱함으로써 각 복셀의 회백질 밀도가 일정하게 유지되도록 보정 (modulation)하였다 (Good et al., 2001). 분석에 사용할 영상은 sigma 3 mm 크기의 등방성 가우시안 커널 (Gaussian Kernel)로 평활화 (smoothing) 과정을 거쳐 신호 대 잡음비 (signal-to-noise ratio)를 증가시켰으며, 최종적으로 획득한 영상을 이용하여 회백질 부피 변화를 통계 분석하였다.

2.8. 통계 분석

모든 통계 분석은 Stata 13.1 (StataCorp., TX, USA)을 사용하였으며 유의수준은 알파 값 0.05 (양측검정)으로 정하였다.

기저시점에서 인구학적 및 임상적 특성이 배정군 간 차이가 있는지 비교하기 위해서 연속형 변수는 일원배치 분산분석을, 범주형 변수는 피셔의 정확도 검정 (Fisher's exact test)을 적용하였다. 통계 분석은 치료 의도 (intent-to-treatment) 집단을 대상으로 하였다.

인지기능 평가 분석에서는 유효성 평가변수인 주의력 및 작업기억력 복합 Z 점수가 시간과 배정군-시간의 상호작용에 따라 변화하는지 비교하기 위해서 반복측정자료를 이용한 혼합효과모형 (mixed effect

model with repeated-measures)을 적용하였다. 교란변수의 영향을 배제한 주의력 또는 작업기억력 복합 Z 점수를 의존변수 (independent variable)로, 배정군-시간의 상호작용 (treatment-by-time interaction)을 고정효과 (fixed effect)로, 연구 대상자를 임의효과 (random effect)로 하였다. 상호작용 효과가 유의미하게 나온 경우 인지기능의 향상 정도가 군 간에 차이가 있는 것으로 보았다. 또한 우울 및 불안 증상이 인지기능에 미치는 영향을 확인하기 위하여 동일한 모형에 해밀턴 우울 척도 점수 또는 불안 척도 점수를 각각 공변량으로 넣고 민감도 분석을 시행하였다.

혈액검사 및 소변검사 결과의 변화를 평가하기 위해서도 반복측정자료를 이용한 혼합효과모형 분석을 시행하였으며, 이때 의존변수는 각 지표의 검사값, 고정효과는 배정군-시간의 상호작용, 임의효과는 연구 대상자, 교란영향을 배제하기 위한 공변량은 나이, 성별, 기저시점 검사 값이었다. 배정군 간 부작용 발생 빈도에 차이가 있는지를 비교하기 위해서는 피서의 정확도 검정을 시행하였다.

뇌 자기공명영상에 대한 통계 분석은 FSL VBM 을 이용한 전처리 과정을 거쳐 생성된 전체 회백질 바이너리 마스크 (binary mask)를 사용하여 해당 마스크 영역 내의 복셀에 대하여 시행되었다. 8 주간의 발효더덕 추출물 복용 이후 배정군-시간의 상호작용이 있는지 확인하기 위하여 FSL 에서 제공하는 반복측정 일반선형모형 (repeated measure general linear model)을 적용하였다. 복셀 별 분석은 FSL 내 randomize 기능을 이용하였으며 다중 비교 (multiple comparison) 문제를 교정하기 위하여 Analysis of Functional NeuroImages (AFNI,

<http://afni.nimh.nih.gov/afni>) 에서 제공하는 3dClustSim

(https://afni.nimh.nih.gov/pub/dist/doc/program_help/3dClustSim.html)

소프트웨어의 Monte Carlo 시뮬레이션을 이용하였다. 반높이너비 (full

width at half maximum, FWHM) 7 mm (약 sigma 3 mm)을 적용하여

3dClustSim 시뮬레이션을 10,000 번 반복하였을 때, 복셀 별 p value 가

0.01 미만이면서 복셀 개수가 최소 168 개인 경우에 $p < 0.05$ 인

유의수준에 해당하였다. 이를 적용하여 복셀 개수가 168 개 이상인 군집

(cluster)을 유의한 차이가 있는 군집으로 정하였다.

발효더덕 추출물 복용에 따른 회백질 부피의 변화를 평가하기
위하여, 각 연구 대상자의 뇌 자기공명영상에서 유의한 변화를 보인

군집 내의 평균 회백질 부피 수치를 추출하여 이를 의존변수로 넣은

혼합 모형 반복 측정 분석을 시행하였다. 고정효과는 배정군-시간의

상호작용, 임의효과는 연구 대상자였으며, 나이, 성별, 기저시점의

회백질 부피를 교란영향을 배제하기 위한 공변량으로 포함하였다.

마지막으로, 유의한 차이를 보인 군집에서 평균 회백질 부피와 인지기능

점수 간의 상관관계를 분석하기 위해서는 피어슨 상관관계 분석

(Pearson correlation analysis)를 적용하였다.

결 과

1. 동물 행동 실험 결과

1.1. Y-미로 실험 분석 결과

스코폴라민으로 유도한 기억 손상을 회복시키는 발효더덕의 효과를 검토하기 위하여 Y-미로 실험을 수행하였다. 변경행동력은 생쥐가 공간적 단서를 파악하고 기억하여 한번 방문한 장소에 다시 가지 않으려는 경향을 이용한 측정치로서 변경행동력이 높을 수록 공간지각능력 및 단기 기억력이 높음을 의미한다.

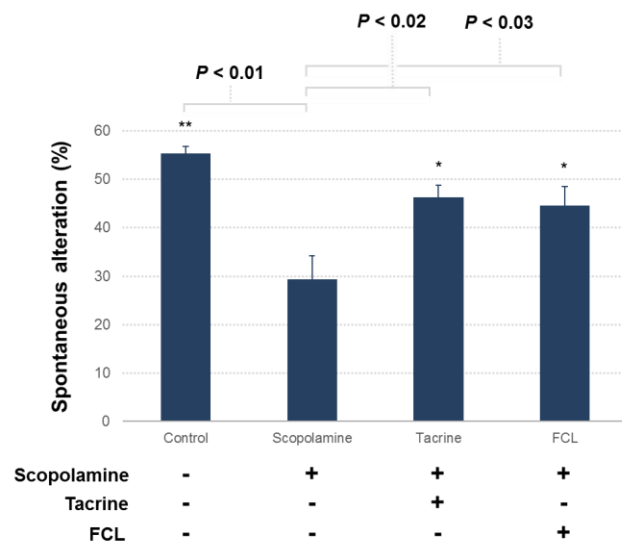
평균 변경행동력은 정상대조군, 스코폴라민 투여군, 타크린 투여군, 발효더덕 추출물 투여군에서 각각 55.4% (표준오차 1.5), 29.3% (표준오차 4.9), 46.2% (표준오차 2.5), 44.6% (표준오차 3.9) 였다 (그림 3A). 측정 결과 변경행동력이 0%인 경우는 분석에서 제외하였다. 정상대조군에 비해서 스코폴라민을 투여한 경우 변경행동력이 유의하게 감소하여 스코폴라민에 의해 기억 손상이 성공적으로 유도되었음을 확인하였다 ($F=10.24$, $p<0.01$). 반면 스코폴라민 투여군에 비하여 타크린 투여군과 발효더덕 추출물 투여군 둘 다 변경행동력이 유의하게 증가하여 스코폴라민에 의한 기억 손상으로부터 회복된 것으로 나타났다 (16.9%, $p=0.02$; 15.3%, $p=0.03$). 발효더덕 추출물에 의한 기억 손상 회복은 타크린에 의한 회복 효과와 유사한 수준이었다.

평균 총 입장 횟수는 정상대조군, 스코폴라민 투여군, 타크린 투여군, 발효더덕 추출물 투여군에서 각각 29.6 회 (표준오차 2.2),

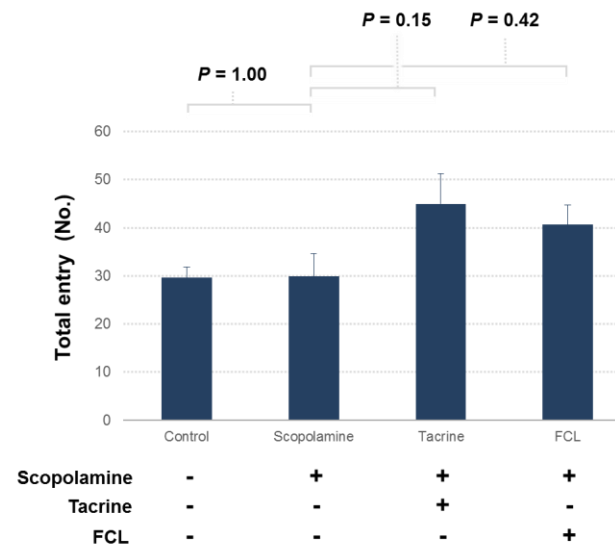
29.9 회 (표준오차 4.7), 45 회 (표준오차 6.2), 40.7 회 (표준오차 4.0)였다 (그림 3B). 실험동물의 전반적인 움직임에 차이가 있는지 확인하기 위하여 평균 총 입장 횟수를 일원배치 분산분석법에 따라 비교 분석한 결과 실험군 간에 유의미한 차이가 있는 것으로 나타났다 ($F=3.06$, $p=0.04$). 실제로 스코폴라민 투여군에 대비하여 타크린 투여군과 발효더덕 추출물 투여군에서 평균적으로 각각 15.1 회, 10.8 회가 증가하는 경향이 있었다. 그러나 Scheffe 의 다중비교분석에 의한 사후검정 결과 실험군 간 비교에서는 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었다 ($p=0.15$; $p=0.42$).

Figure 3. Effects of Fermented *Codonopsis lanceolata* on Scopolamine-Induced Memory Impairment in the Y-maze Test

(A)



(B)



Mice were orally treated with distilled water, tacrine (10 mg/kg body weight), or FCL (800 mg/kg body weight) once a day for 2 weeks. Memory impairment was induced by intraperitoneal injection of scopolamine. The Y-maze test was performed 30 minutes after scopolamine treatment. (A) The percentage of spontaneous alternation was examined as an index of short-term memory. (B) The total number of arm entries was measured as an indicator of locomotor activity. The results are presented as mean \pm SEM (n=9-10). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the scopolamine group. FCL, Fermented *Codonopsis lanceolata*.

2. 인체적용시험 결과

2.1. 연구 대상자의 특성

총 170 명을 대상으로 일차적으로 전화 선별 검사를 하여 참여 의사가 없거나 제외 기준에 해당하는 83 명을 제외한 후 총 87 명을 대상으로 방문 선별 검사를 진행하였다. 그 중 선정 기준을 통과한 최종 60 명이 발효더덕 추출물 고용량 투여군, 발효더덕 추출물 저용량 투여군, 또는 위약대조군으로 무작위 배정되었다 (그림 4). 8 주간의 인체적용시험 참여를 완료한 연구 대상자는 60 명 중 55 명 (91.7%)이었으며 고용량 투여군 19 명 (95%), 저용량 투여군 17 명 (85%), 위약대조군 19 명 (95%)으로 세 군의 완료율에는 유의미한 차이가 없었다 (Fisher's exact $p=0.60$). 연구 대상자 중 3 명은 연구 참여 동의를 철회하였고, 1 명은 연구 기간 중 안면종양 발견으로 제외 기준에 해당하여 도중 탈락하였다. 1 명은 순응도가 저조하여 제외 기준에 해당하여 분석에서 제외되었다.

기저시점에서 발효더덕 추출물 고용량 투여군, 저용량 투여군 및 위약대조군의 평균 나이는 각각 54.7 세 (표준편차 6.0), 50.2 세 (표준편차 7.7), 50.0 세 (표준편차 9.2)로 군 간의 유의한 차이는 관찰되지 않았다 ($p=0.10$). 각 군의 성비는 여자가 각각 18 명 (90%), 11 명 (55%), 14 명 (70%)로 군 간에 다소 차이가 있었으나 유의한 정도는 아니었다 (Fisher's exact $p=0.06$). 교육 연한, 사회경제적 수준, 결혼상태에서도 유의한 인구학적 차이는 나타나지 않았으며, 기저시점에서의 MMSE 점수, 우울 및 불안 점수, IQ 점수 또한 군 간에

차이가 관찰되지 않았다. 본 연구의 일차 평가변수인 주의력 복합 Z 점수는 각각 -0.29 (표준편차 0.18), -0.31 (표준편차 0.21), -0.29 (표준편차 0.22)로서 세 군 사이에 유의미한 차이가 없었다 ($p=0.96$) (표 4).

투약일지 기록 내용으로 계산한 복용 순응도는 고용량 투여군, 저용량 투여군, 위약대조군에서 각각 94.9%, 94.0%, 89.2% 였으며 세 군간에 유의한 차이가 나지 않았다 ($p=0.58$).

Figure 4. Flow Diagram of Study Participants for Screening, Exclusions, Randomization, and Follow-up

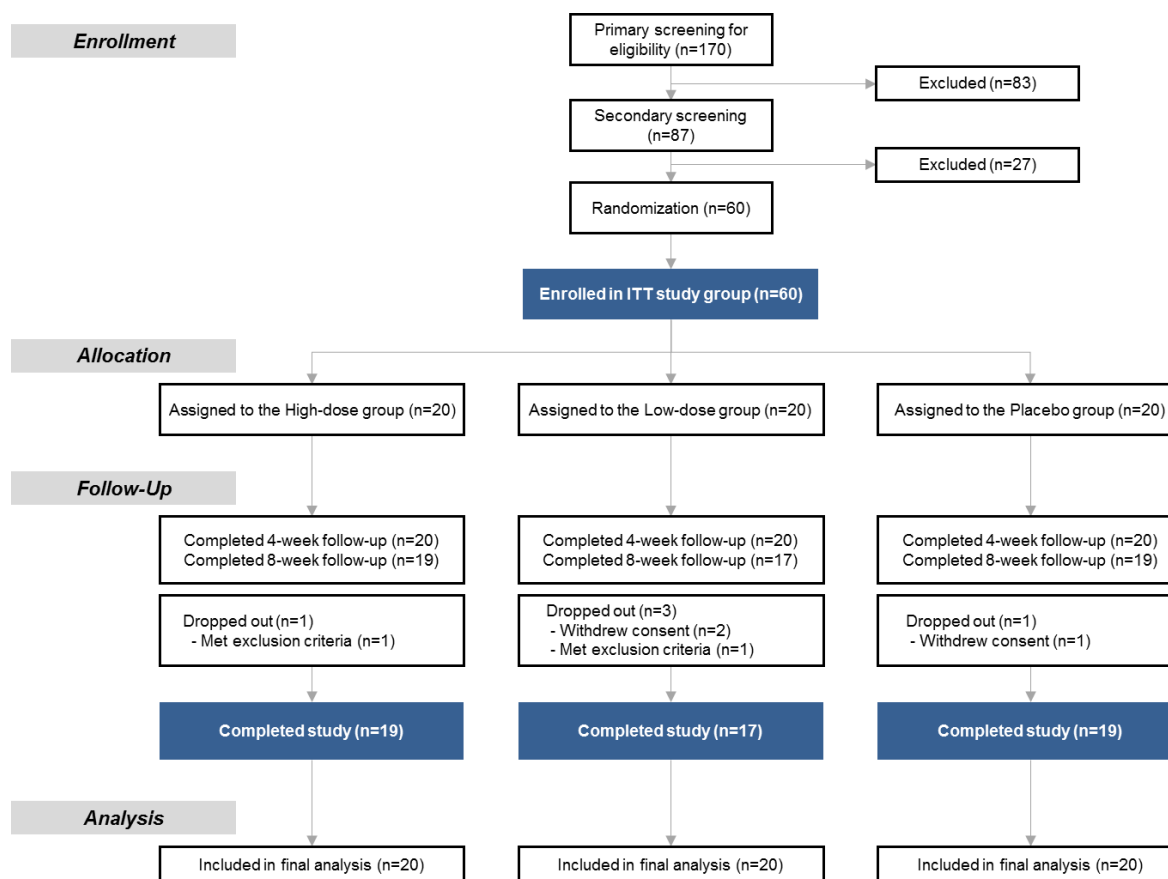


Table 4. Characteristics of Study Participants at Baseline

Characteristics	Treatment groups		
	FCL (n=40)		Placebo (n=20)
	High-dose* (n=20)	Low-dose* (n=20)	
<i>Sociodemographic characteristics</i>			
Age, mean (SD), years	54.7 (6)	50.2 (7.7)	50 (9.2)
Sex, female, No. (%)	18 (90)	11 (55)	14 (70)
Education, mean (SD), years	9.3 (2.1)	9.1 (2.2)	8.3 (2.4)
Socioeconomic status, No. (%)			
Upper	5 (25)	6 (30)	10 (50)
Lower	15 (75)	14 (70)	10 (50)
Marital status, No. (%)			
Married	17 (85)	18 (90)	15 (75)
Never married	2 (10)	2 (10)	2 (10)
Divorced, widowed, or separated	1 (5)	0 (0)	3 (15)
<i>Clinical characteristics</i>			

MMSE, mean (SD), score	28 (1.1)	28 (1.1)	28 (0.9)
Hamilton Depression Rating Scale, mean (SD), score	1 (1.5)	0.6 (0.7)	0.6 (1)
Hamilton Anxiety Rating Scale, mean (SD), score	0.8 (1.2)	0.5 (0.6)	0.5 (1.1)
Cognitive measures			
IQ, mean (SD)	117.8 (9.6)	118.5 (10.7)	114.6 (11.8)
Attention, domain composite, mean (SD)	-0.29 (0.18)	-0.31 (0.21)	-0.29 (0.22)

The three groups did not show any significant difference in baseline characteristics.

* FCL was orally administered in two different dosing schedules; high-dose schedule with 1050 mg/day and low-dose schedule with 525 mg/day of FCL.

** Z-scores of the attention domain were adjusted for age, sex, IQ, and baseline performance level. Positive values of changes in adjusted Z-scores represent improved attention performance with treatment.

Abbreviations: SD, standard deviation; MMSE, Mini Mental Status Examination; IQ, intelligent quotient; FCL, fermented *Codonopsis lanceolata*.

2.2. 인지기능 평가 분석 결과

발효더덕 추출물 복용에 따른 인지기능의 변화를 분석하기 위하여 혼합 모형 반복측정 분석을 시행하여 각 배정군 내에서의 시간효과와 시간-배정군 상호작용 효과를 확인하였다. 인지기능은 주의력과 작업기억력 두 가지로 평가하였으며, 각각 주의력 복합 Z 점수와 작업기억력 복합 Z 점수로 분석하였다.

2.2.1. 주의력 분석 결과

각 배정군 내에서의 주의력에 대한 시간효과를 분석한 결과, 8 주간의 발효더덕 추출물 복용 이후에 두 군 모두에서 주의력 복합 Z 점수가 유의하게 증가한 것으로 나타났다 (고용량 투여군, $z=4.26$, p for time effect <0.01 ; 저용량 투여군, $z=4.07$, p for time effect <0.01 ; 발효더덕 추출물 투여군 전체, $z=5.90$, p for time effect <0.01). 그러나 위약대조군에서는 시간에 따른 주의력 변화가 관찰되지 않았다 ($z=1.18$, p for time effect $=0.24$) (그림 5).

주의력의 변화 정도는 위약대조군에 비해서 발효더덕 추출물 고용량 투여군과 저용량 투여군 모두에서 유의하게 나타났다 (고용량 투여군, $z=2.18$, p for interaction $=0.03$; 저용량 투여군, $z=2.10$, p for interaction $=0.04$; 발효더덕 추출물 투여군 전체, $z=2.48$, $p=0.01$). 두 군 모두 위약대조군에 비해서는 유의하게 주의력이 증가하였으며, 고용량 투여군과 저용량 투여군 간에는 차이가 없었다 ($z=0.05$, p for interaction $=0.96$).

주의력 복합 Z 점수가 변화한 정도는 발효더덕 추출물 고용량 투여군에서 평균 0.44 (표준오차 0.09), 저용량 투여군에서 평균 0.41 (표준오차 0.12), 위약대조군에서 평균 0.12 (표준오차 0.13) 였다. 또한 주의력 복합 Z 점수 변화 정도의 평균은 고용량 투여군과 위약대조군을 비교하였을 때 0.32 (표준오차 0.16), 저용량 투여군과 위약대조군을 비교하였을 때 0.29 (표준오차 0.18)의 차이가 있었다. 주의력 복합 Z 점수 및 개별 소검사의 Z 점수 변화에 대한 평균과 표준오차 값들은 표 5 에 상세히 기술하였다.

2.2.2. 작업기억력 분석 결과

작업기억력에 대하여 각 배정군 내에서의 시간효과를 분석한 결과, 8 주간의 발효더덕 추출물 복용 이후에 발효더덕 추출물 투여군 및 위약대조군 모두에서 작업기억력 복합 Z 점수는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다 (고용량 투여군, $z=1.38$, p for time effect=0.17; 저용량 투여군, $z=1.27$, p for time effect=0.20; 위약대조군 $z=0.23$, p for time effect=0.81). 발효더덕 추출물 고용량 투여군과 저용량 투여군 전체에 대한 분석에서는 작업기억력이 다소 증가하는 경향을 보이기는 하였으나 (발효더덕 추출물 투여군 전체, $z=1.87$, p for time effect=0.06), 알파 수준 0.05 를 기준으로 하였을 때 유의미하지는 않았다.

시간과 배정군의 상호작용 분석 결과에서도 유의한 차이가 관찰되지 않아 작업기억력 변화 정도는 위약대조군에 비해서 발효더덕 추출물 고용량 투여군 및 저용량 투여군 둘 다 차이가 없는 것으로 관찰되었다 (고용량 투여군, $z=0.83$, p for interaction=0.41; 저용량 투여군, $z=0.75$, p

for interaction=0.45; 발효더덕 추출물 투여군 전체 $z=0.91$, $p=0.36$).

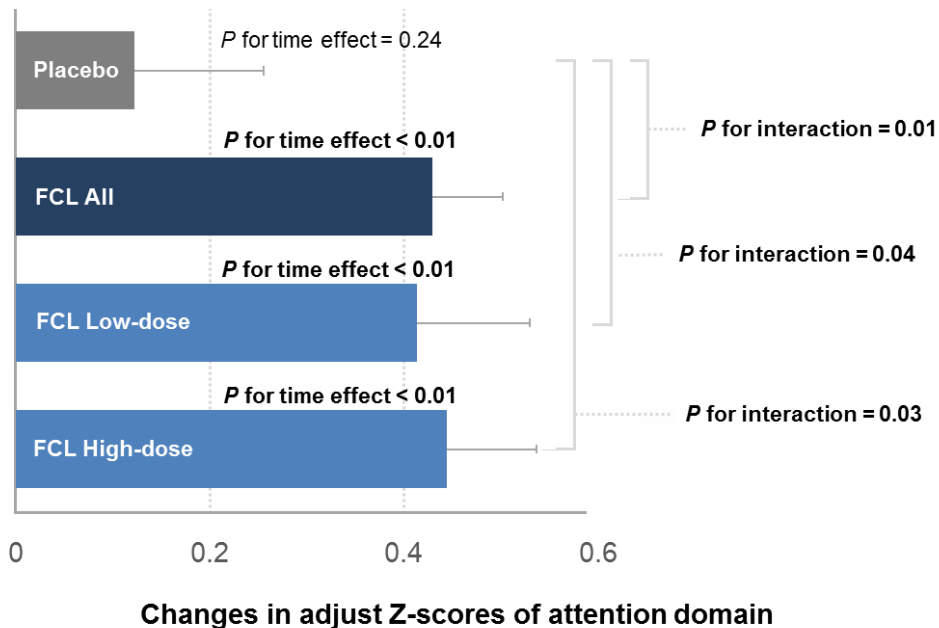
고용량 투여군과 저용량 투여군 간에도 작업기억력 변화 정도는 차이가 없었다 ($z=0.08$, p for interaction=0.94). 작업기억력 복합 Z 점수 및 개별 소검사의 Z 점수 변화에 대한 평균과 표준오차 값들은 표 6에 상세히 기술하였다.

2.2.3. 민감도 분석 결과

인지기능 평가 분석 결과가 우울, 불안의 호전에 기인하는 것이 아님을 확인하기 위하여 우울 및 불안 점수를 공변량으로 하는 민감도 분석을 수행하였다. 우울 점수를 공변량으로 하여 민감도 분석을 수행한 결과, 앞선 결과와 동일하게 주의력 복합 Z 점수 변화는 발효더덕 추출물 투여군에서 증가하였고 (고용량 투여군, $z=2.12$, p for interaction=0.03; 저용량 투여군, $z=2.06$, p for interaction=0.04; 발효더덕 추출물 투여군 전체, $z=2.42$, $p=0.02$) 작업기억력 복합 Z 점수 변화는 군 간 차이가 없었다 (고용량 투여군, $z=0.72$, p for interaction=0.50; 저용량 투여군, $z=0.76$, p for interaction=0.45; 발효더덕 추출물 투여군 전체, $z=0.85$, $p=0.34$). 불안 점수를 공변량으로 하여 민감도 분석을 수행한 결과 또한 주의력 복합 Z 점수의 변화는 발효더덕 추출물 투여군에서 증가하였으며 (고용량 투여군, $z=2.11$, p for interaction=0.03; 저용량 투여군, $z=2.06$, p for interaction=0.04; 발효더덕 추출물 투여군 전체, $z=2.41$, $p=0.02$) 작업기억력 복합 Z 점수 변화는 군 간 차이가 없었다 (고용량 투여군, $z=0.70$, p for interaction=0.48; 저용량 투여군, $z=0.69$, p for interaction=0.49; 발효더덕 추출물 투여군 전체, $z=0.81$, $p=0.42$).

따라서 인지기능 평가 분석 결과는 우울, 불안 점수에 대하여 민감하지 않은 것으로 확인되었다.

Figure 5. Effects of Fermented *Codonopsis lanceolata* on Attention Performance



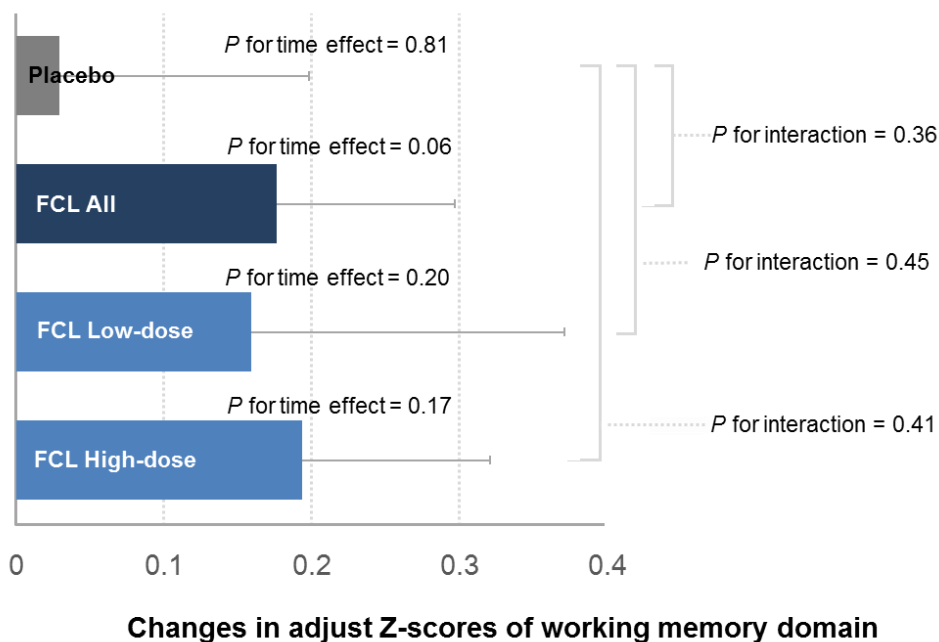
Z-scores of the attention domain were adjusted for age, sex, IQ, and baseline performance level. Positive values of changes in adjusted Z-scores represent improved attention performance with treatment.

Attention performance significantly improved over the 8-week treatment period in both FCL groups (High-dose: p for time effect < 0.01 ; Low-dose: p for time effect < 0.01), while attention performance did not change in the placebo group (p for time effect $= 0.24$). When each FCL group was compared with the Placebo group, a significant interaction effect between treatment group and attention performance change was observed (High-dose vs. Placebo, p for interaction $= 0.03$; Low-dose vs. Placebo, p for interaction $= 0.04$), suggesting a significant increase in attention performance after FCL treatment. No significant difference in attention performance change was found between the two FCL groups.

Error bars represent standard errors of the mean.

Abbreviation: FCL, Fermented *Codonopsis lanceolata*.

Figure 6. Effects of Fermented *Codonopsis lanceolata* on Working Memory Performance



Z-scores of the working memory domain were adjusted for age, sex, IQ, and baseline performance level. Positive values of changes in adjusted Z-scores represent improved working memory performance with treatment.

Working memory performance did not change significantly over the 8-week treatment period in both FCL groups (High-dose: p for time effect=0.17; Low-dose: p for time effect=0.20; Placebo: p for time effect=0.24). No significant difference in working memory performance change after FCL treatment was found. (High-dose vs. Placebo, p for interaction=0.41; Low-dose vs. Placebo, p for interaction=0.45).

Error bars represent standard errors of the mean.

Abbreviation: FCL, Fermented *Codonopsis lanceolata*.

Table 5. Changes Within and Between Treatment Groups in Adjusted Z-Scores of Attention Domains from Baseline to Week 8

Variables	Mean changes in adjusted Z scores from baseline and to week 8 (SEM)				Mean difference (SEM)
	FCL High-dose	FCL Low-dose	FCL All	Placebo	FCL vs Placebo
Attention, domain composite	0.44 (0.09)	0.41 (0.12)	0.43 (0.07)	0.12 (0.13)	0.31 (0.14)
Letter-Number Span, total number	0.48 (0.41)	0.41 (0.42)	0.45 (0.29)	0.26 (0.36)	0.19 (0.48)
Digit span, forward	-0.37 (0.36)	0.69 (0.37)	0.13 (0.27)	-0.18 (0.34)	0.31 (0.44)
Match to sample visual search, mean correct reaction time	1.6 (0.29)	1.01 (0.40)	1.32 (0.24)	1.11 (0.35)	0.21 (0.42)
Reaction time, mean five-choice reaction time	0.12 (0.09)	0.04 (0.09)	0.08 (0.07)	0.06 (0.19)	0.02 (0.17)
Reaction time, mean simple reaction time	0.48 (0.13)	-0.06 (0.23)	0.22 (0.14)	0.06 (0.15)	0.17 (0.22)
Rapid visual information processing, mean latency	0.27 (0.22)	0.50 (0.35)	0.37 (0.20)	-0.1 (0.22)	0.48 (0.32)
Stop signal task, stop signal reaction time (last half)	0.52 (0.39)	0.31 (0.31)	0.42 (0.25)	-0.34 (0.25)	0.76 (0.39)

Values only from participants who underwent all of the five neuropsychological tests at Baseline and Week 8 were included in the analysis. Positive change scores represent cognitive improvement after treatment.

Abbreviation: FCL, Fermented *Codonopsis lanceolata*.

Table 6. Changes Within and Between Treatment Groups in Adjusted Z-Scores of Working Memory Domains from Baseline to Week 8

Variables	Mean changes in adjusted Z scores from baseline and to week 8 (SEM)				Mean difference (SEM)
	FCL High-dose	FCL Low-dose	FCL All	Placebo	FCL All vs Placebo
Working memory, domain composite	0.19 (0.13)	0.16 (0.21)	0.18 (0.12)	0.03 (0.17)	0.15 (0.20)
Digit span, backward	0.03 (0.34)	0.00 (0.42)	0.01 (0.27)	0.05 (0.36)	-0.04 (0.45)
Spatial working memory, total errors	0.65 (0.21)	0.25 (0.32)	0.46 (0.19)	0.48 (0.31)	0.02 (0.34)
Spatial span, span length	0.00 (0.14)	0.22 (0.33)	0.10 (0.17)	-0.45 (0.23)	0.55 (0.29)

Values only from participants who underwent all of the five neuropsychological tests at Baseline and Week 8 were included in the analysis. Positive change scores represent cognitive improvement after treatment.

Abbreviation: FCL, Fermented *Codonopsis lanceolata*.

2.3. 안전성 평가 분석 결과

각 배정군의 기저시점, 4 주차, 8 주차에 시행한 혈액검사 및 소변검사에서 얻은 결과는 표 7 과 같다. 혈액검사 및 소변검사의 각 지표에 대하여 시간과 배정군의 상호작용 효과를 확인하기 위하여 혼합 모형 반복측정 분석을 시행하였다.

혈액검사에서 절대 호중구수 (absolute neutrophil count)의 변화는 위약대조군을 기준으로 하였을 때 저용량 투여군에서는 차이가 없었으나 고용량 투여군에서는 8 주 후의 감소가 유의한 것으로 나타났다 ($z=-2.31$, p for interaction=0.02). 다만 자료를 살펴본 결과 위약대조군에서 한 연구 대상자의 8 주차 절대 호중구수 값이 기준치를 벗어나는 범위에 있어서 ($7150/\mu\text{L}$), 이를 제외하고 분석한 결과에서는 위약대조군과 고용량 투여군 간에도 8 주차의 절대 호중구수 변화에는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다 ($z=-1.86$, p for interaction=0.06). 절대 호중구수가 기준치를 벗어난 연구 대상자를 추적 모니터링한 결과 임상적 특이사항이나 이상반응이 발견되지 않은 것을 확인하였다.

혈청 크레아티닌 (serum creatinine)은 기저시점에 비해 4 주차 검사에서 고용량 투여군과 저용량 투여군 모두 유의미하게 증가했다가 (고용량 투여군, $z=2.1$, p for interaction=0.04; 저용량 투여군, $z=2.54$, p for interaction=0.01) 8 주차 검사에서는 기저시점과 차이가 없는 것으로 관찰되었다 (고용량 투여군, $z=0.93$, p for interaction=0.35; 저용량 투여군, $z=1.44$, p for interaction=0.15). 혈청 크레아티닌의 4 주차 결과는 고용량 투여군에서 평균 0.80 mg/dL (표준편차 0.16), 저용량 투여군에서 평균 0.88 mg/dL (표준편차 0.12), 위약투여군에서 평균 0.77 mg/dL (표준편차

0.16)로서 정상참고치 범위를 크게 벗어나지 않았으며 이와 관련된 이상반응을 보고한 경우 또한 없었다. 이 외의 혈액검사 및 소변검사 지표들에 대해서는 세 배정군 간에 시간에 따른 변화의 정도에 유의미한 차이가 나타난 항목은 관찰되지 않았다.

UKU side effect rating scale 로 기록된 모든 이상반응의 빈도는 표 8 에 나타내었다. 수면시간 증가를 보고한 빈도는 고용량 투여군에서 6 회 (15.4%), 저용량 투여군에서 0 회 (0%), 위약대조군에서 2 회 (5.1%)로 군 간에 유의미한 차이가 관찰되었다 (Fisher's exact $p=0.03$). 이 외 항목의 빈도와 연구기간 내 전체 이상반응 누적 빈도에 대해서는 세 배정군 간에 유의미한 차이가 없는 것으로 나타났다 (전체 이상반응 누적 빈도: 고용량 투여군 16 회 (41.0%); 저용량 투여군 7 회 (18.9%); 위약대조군 11 회 (28.2%); Fisher's exact $p=0.11$). 연구기간 중 연구 참여를 중단해야 하는 중대한 이상반응 (serious adverse event)이 보고되거나 관찰된 바는 없었다.

Table 7. Summary of Laboratory Monitoring for Safety Assessments Obtained at Each Study Visit

Laboratory profiles	FCL High-dose (n = 20)	FCL Low-dose (n = 20)	FCL All (n = 40)	Placebo (n = 20)
	mean (SD)	mean (SD)	mean (SD)	mean (SD)
Absolute neutrophil count (/μL)				
Baseline	3024 (850)	2788 (911)	2906 (878)	2962 (937)
Week 4	2614 (968)	2731 (1199)	2672 (1077)	2786 (1044)
Week 8*	2689 (980)	2496 (740)	2598 (868)	3226 (1281)
Hemoglobin (g/dL)				
Baseline	13.4 (0.9)	14.6 (1.3)	14.0 (1.3)	14.1 (1.4)
Week 4	13.5 (1.1)	14.6 (1.2)	14.1 (1.3)	13.8 (1.4)
Week 8	13.3 (1.2)	14.5 (1.2)	13.9 (1.4)	14.0 (1.3)
Hematocrit (%)				
Baseline	40.4 (2.4)	43.4 (4.0)	41.9 (3.6)	41.9 (3.6)
Week 4	41.4 (3.2)	44.4 (3.9)	42.9 (3.9)	42.3 (3.8)
Week 8	41.4 (3.6)	44.3 (4.7)	42.8 (4.3)	43.1 (3.8)
Platelet (10³/μL)				
Baseline	227.5 (51.8)	247.4 (48.4)	237.4 (50.5)	235.1 (66.8)
Week 4	244.7 (49.2)	245.8 (46.4)	245.3 (47.2)	249.2 (65.3)
Week 8	233.0 (42.7)	247.1 (48.7)	239.6 (45.5)	243.4 (66.4)
Serum creatinine (mg/dL)				

Baseline	0.79 (0.12)	0.86 (0.15)	0.83 (0.14)	0.81 (0.12)
Week 4	0.80 (0.16)	0.88 (0.12)	0.84 (0.14)	0.77 (0.16)
Week 8	0.81 (0.15)	0.87 (0.13)	0.84 (0.14)	0.80 (0.15)
Serum BUN (mg/dL)				
Baseline	14.8 (3.4)	13.3 (2.5)	14.1 (3.1)	14.0 (3.4)
Week 4	14.4 (3.9)	13.9 (3.7)	14.1 (3.8)	12.8 (3.0)
Week 8	14.2 (2.9)	13.6 (2.9)	13.9 (2.9)	13.5 (3.0)
AST (units/L)				
Baseline	23.6 (6.8)	22.2 (6.1)	22.9 (6.4)	21.6 (6.5)
Week 4	23.3 (6.1)	23.6 (8.6)	23.4 (7.4)	20.6 (4.3)
Week 8	20.9 (5.1)	23.9 (10)	22.3 (7.8)	20.3 (5.3)
ALT (units/L)				
Baseline	23.1 (12.2)	23.3 (12.0)	23.2 (12.0)	21.6 (15.3)
Week 4	21.0 (8.9)	24.4 (19.4)	22.7 (15.0)	18.2 (9.1)
Week 8	19.4 (9.3)	24.6 (19.2)	21.9 (14.8)	18.5 (9.7)
Glucose (mg/dL)				
Baseline	96.0 (6.4)	93.7 (7.6)	94.9 (7.0)	92.4 (6.6)
Week 4	97.4 (5.8)	93.2 (6.6)	95.3 (6.5)	90.4 (5.8)
Week 8	97.2 (9.3)	92.6 (6.3)	95.0 (8.2)	92.7 (8.9)
Cholesterol (mg/dL)				
Baseline	209.1 (37.6)	200.8 (29.6)	205.0 (33.6)	201.7 (34.3)
Week 4	209.2 (37.3)	206.4 (37.0)	207.8 (36.7)	199.4 (35.9)

Week 8	213.1 (35.7)	205.1 (39.3)	209.3 (37.1)	204.6 (31.9)
BMI (kg/m2)				
Baseline	25.5 (2.9)	23.4 (2.9)	24.4 (3.1)	23.7 (2.6)
Week 8	25.7 (2.8)	23.7 (2.9)	24.7 (3.0)	23.8 (2.6)

The absolute neutrophil count value of one participant in the Placebo group at Week 8 (7150/ μ L) was excluded in the analysis.

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen; BMI, body mass index.

Table 8. Summary of Adverse Events Occurring during the Treatment Period

Type of adverse event	FCL High-dose (n=20)		FCL Low-dose (n=20)		FCL All (n = 40)		Placebo (n=20)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Any adverse event	16	41	7	18.9	23	30.3	11	28.2
<i>Psychiatric</i>								
Concentration difficulties	1	2.6	2	5.4	3	3.9	0	0
Asthenia/Lassitude/Increased Fatigability	2	5.1	2	5.4	4	5.3	1	2.6
Sleepiness/Sedation	2	5.1	2	5.4	4	5.3	1	2.6
Failing Memory	1	2.6	0	0	1	1.3	1	2.6
Depression	0	0	2	5.4	2	2.6	0	0
Increased Duration of Sleep	6	15.4	0	0	6	7.9	2	5.1
Reduced Duration of Sleep	3	7.7	2	5.4	5	6.6	2	5.1
Increased Dream Activity	1	2.6	2	5.4	3	3.9	0	0
Emotional Indifference	2	5.1	2	5.4	4	5.3	0	0
<i>Neurologic</i>								
Paresthesia	0	0	1	2.7	1	1.3	0	0
<i>Autonomic</i>								
Accommodation Disturbances	1	2.6	0	0	1	1.3	0	0

Reduced Salivation	0	0	1	2.7	1	1.3	0	0
Nausea/Vomiting	2	5.1	0	0	2	2.6	0	0
Diarrhea	2	5.1	0	0	2	2.6	1	2.6
Constipation	4	10.3	1	2.7	5	6.6	2	5.1
Polyuria/Polydipsia	3	7.7	0	0	3	3.9	0	0
Orthostatic Dizziness	0	0	1	2.7	1	1.3	0	0
Palpitations/Tachycardia	1	2.6	0	0	1	1.3	0	0
Increased Tendency to Sweating	0	0	0	0	0	0	1	2.6
Other								
Rash	0	0	0	0	0	0	1	2.6
Pruritus	1	2.6	0	0	1	1.3	2	5.1
Weight gain	1	2.6	2	5.4	3	3.9	0	0
Weight loss	0	0	0	0	0	0	1	2.6
Headache	1	2.6	0	0	1	1.3	2	5.1

Adverse events were assessed using the UKU Side Effect Rating Scale at Week 4 and Week 8. The cumulative adverse event rate was measured by calculating the total cumulative observed cases among the total number of side effect assessment during the study period; 39 for the high-dose group, 37 for the low-dose group and 39 for the placebo group, respectively.

2.4. 복셀기반 형태분석 결과

복셀기반 형태분석을 실시한 결과, 전두엽에 위치한 2 개의 군집에서 위약대조군에 비해 발효더덕 추출물 투여군의 회백질 부피가 유의하게 증가한 것으로 관찰되었다 (표 9, 그림 7). 회백질 부피 증가를 보인 군집은 다음과 같다: 우측 하전두이랑 안와부 (right inferior frontal gyrus, pars orbitalis) [(x, y, z) = (20, 22, -20), cluster size = 1560 mm³, maximum t value = 4.20], 좌측 중간전두이랑 (left middle frontal gyrus) [(x, y, z) = (-28, 58, 6), cluster size = 1560 mm³, maximum t value = 3.66]. 위약대조군에 비해 발효더덕 추출물 투여군에서 회백질 부피가 감소한 뇌 부위는 관찰되지 않았다.

유의한 증가를 보인 군집의 평균 회백질 부피 값을 추출하여 8 주간 해당 군집의 회백질 부피 변화 정도를 위약대조군과 발효더덕 추출물 투여군 간에 비교한 결과, 우측 하전두이랑 안와부 ($z=4.54$, p for interaction<0.01)와 좌측 중간전두이랑 ($z=3.91$, p for interaction<0.01) 모두 유의한 상호작용 효과를 보였다. 그러나 주의력 향상 정도와 회백질 부피 증가 정도 간의 상관관계는 관찰되지 않았다 (우측 하전두이랑 안와부, $r=0.06$, $p=0.74$; 좌측 중간전두이랑, $r=-0.09$, $p=0.60$). 아울러 작업기억력 향상과 회백질 부피 증가 정도 간에도 유의한 상관관계는 관찰되지 않았다 (우측 하전두이랑 안와부, $r=0.13$, $p=0.47$; 좌측 중간전두이랑, $r=-0.21$, $p=0.23$).

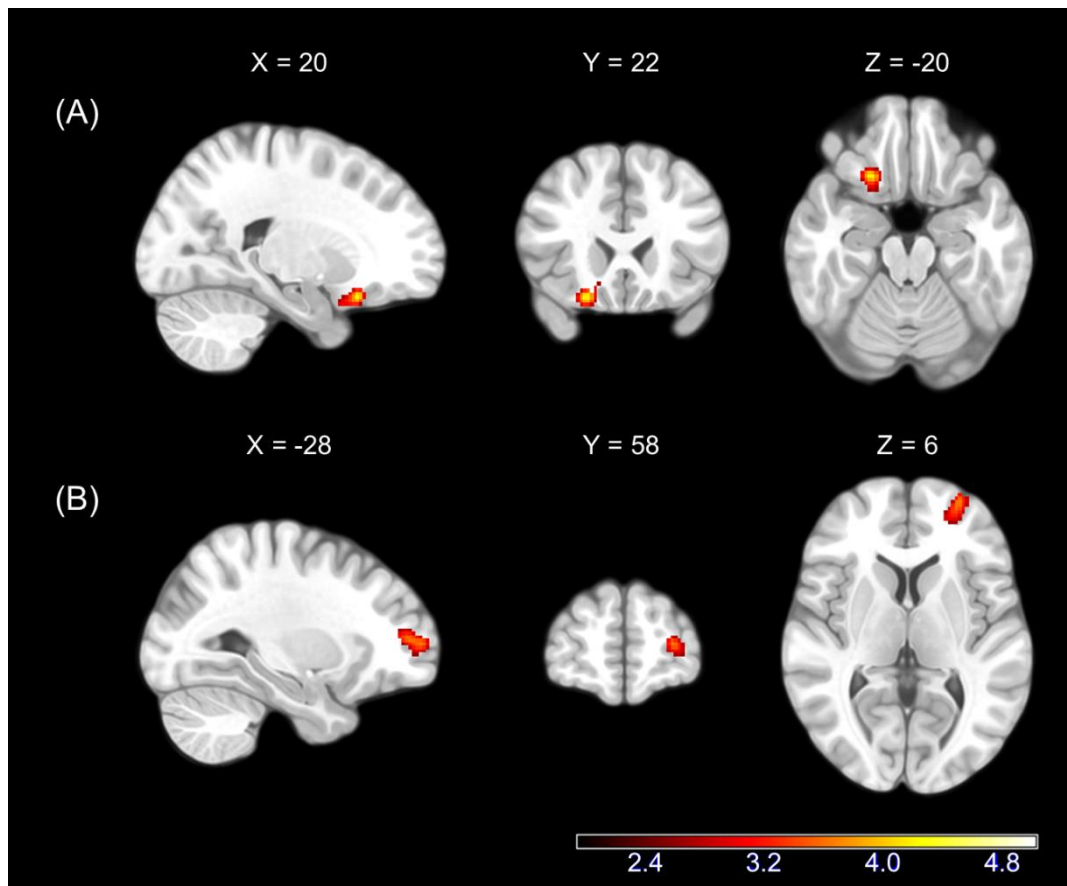
Table 9. Detailed Information of Significantly Increased Clusters of Voxel-Based Morphometric Analysis with Fermented *Codonopsis lanceolata* Treatment

Brain regions	Cluster size (mm ³)	Maximum t value	MNI atlas coordinates (location of maximum t-value)		
			x	y	z
Inferior frontal gyrus, pars orbitalis (R)	1560	4.20	20	22	-20
Middle frontal gyrus (L)	1560	3.66	-28	58	6

Voxel-wise paired t-tests were used to define clusters of significant changes in gray matter volume with 8-week treatment of fermented *Codonopsis lanceolata*. Regions of significant changes at a cluster-corrected $p < 0.05$ were defined as clusters. There were no clusters showing significant decrease in gray matter volume with the treatment of fermented *Codonopsis lanceolata*.

Abbreviations: MNI, Montreal Neurological Institute; L, left; R, right.

Figure 7. Cluster of Significant Group-by-Time Interaction on Gray Matter Volume



The figure depicts the regions where the extent of gray matter volume change was greater in the combined fermented *Codonopsis lanceolata* group compared to the placebo group. (A) Right inferior frontal gyrus, pars orbitalis. (B) Left middle frontal gyrus.

Corresponding in-plane MNI coordinate is shown below each image. The color bar represents the t-value range.

고 찰

1. 연구 결과 요약

본 연구에서는 신경보호 효과가 알려져 있는 발효더덕 추출물의 경구투여에 따른 인지기능 향상 효과를 동물행동실험 및 인체적용시험을 통하여 확인하였다.

동물행동실험은 4 주령 수컷 ICR 생쥐를 대상으로 2 주간 발효더덕 추출물을 사전 경구투여 한 후 기억 손상을 유도하고 Y-미로 실험을 실시하여 인지기능 저하 예방 효과를 측정하였다. 발효더덕 추출물 투여군에서 기억 손상이 회복되는 효과가 유의미하게 관찰되었으며 회복 정도는 치매 치료제인 타크린에 의한 향상과 비슷한 수준이었다.

인체적용시험은 만 20 세-65 세 사이의 주관적 인지기능 저하를 호소하는 성인을 대상으로 8 주간 무작위, 이중맹검, 위약-대조 시험으로 수행되었으며 유효성 평가변수로 인지기능 영역 중 주의력과 작업기억력을 평가하였다. 8 주간 발효더덕 추출물을 복용하였을 때, 발효더덕 추출물을 투여한 군은 투여 용량에 상관 없이 위약대조군에 비해서 주의력이 증가한 것으로 관찰되었다. 발효더덕 고용량 투여군과 저용량 투여군 사이에는 유의한 차이가 관찰되지 않아 주의력 향상 정도는 투여 용량에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 반면 작업기억력은 8 주간 투여 이후에 발효더덕 추출물 투여군과 위약대조군 모두에서 차이를 보이지 않았으며 세 군 간에 유의한 차이를 보이지

않았다. 주의력과 작업기억력의 결과는 우울 척도 점수와 불안 척도 점수를 공변량으로 한 민감도 분석에서도 동일하여, 주의력 향상은 우울 또는 불안의 호전에 기인하지 않는 것으로 확인되었다.

안전성 평가변수로서 측정한 실험실적 검사결과 및 부작용 보고 빈도는 군 간에 임상적 의미가 있는 차이를 보이지 않았다.

탐색 분석에서 뇌 내 회백질 부피를 비교하였을 때, 위약대조군에 비해 발효더덕 추출물 투여군에서 전두엽에 속하는 두 부위의 군집의 회백질 부피가 증가한 것으로 나타났다. 발효더덕 추출물 투여군에서 회백질 부피가 감소한 뇌 부위는 관찰되지 않았다. 그러나 군집의 회백질 부피와 주의력 또는 작업기억력 수행 정도의 상관 분석에서는 유의한 상관관계가 발견되지 않았다.

결론적으로 발효더덕 추출물의 경구투여는 인지기능, 특히 주의력을 향상시키며 전두엽의 부위의 회백질 부피를 증가시키는 것을 확인하였다.

2. 발효더덕 추출물 경구투여의 인지기능 증진 효과

본 연구 중 동물행동실험에서는 발효더덕 추출물의 복용이 스코폴라민으로 유도된 기억 손상을 회복시킨 것으로 나타났으며, 인체적용시험에서는 주관적 인지기능 저하를 호소하는 성인의 주의력이 발효더덕 추출물 섭취에 의해 유의하게 향상됨을 확인하였다. 이는 선행 전임상 연구에서 발효더덕 추출물이 세포보호효과를 가지며 동물에서 기억력 저하를 회복시킨다는 기존 결과와 일치한다고 볼 수 있다.

인지기능 증진은 정서적 호전이나 생물학적인 개선 등의 기전으로 발현될 수 있다. 본 연구의 인체적용시험에서 주의력 향상이 우울 및 불안 점수에 대하여 민감하지 않은 것으로 확인된 바에 따르면, 발효더덕 추출물의 효과는 우울이나 불안의 호전과 같은 정서적 요인과는 독립적인 기전으로 나타나는 것으로 생각된다.

가능성 있는 기전 중 한가지는 발효더덕 내 유효생리활성성분에 의한 **BDNF** 증가이다. 더덕의 주요 유효성분인 폴리페놀과 사포닌이 **BDNF** 발현을 증가시킨다는 연구들이 발표된 바 있으며, 발효더덕 추출물을 경구투여한 생쥐의 해마에서 **BDNF** 증가가 검출되었다. 이를 비추어 볼 때 발효더덕 추출물 투여는 **BDNF** 분비를 증가시키고 이에 따라 뇌 내 시냅스 가소성이 증가하여 주의력이 개선되었을 가능성을 생각해 볼 수 있다 (Weon et al., 2014).

한편 본 연구의 동물행동실험에서는 발효더덕 추출물의 복용이 스코폴라민으로 유도된 기억 손상을 회복시킨 것으로 나타났다. 스코폴라민은 아세틸콜린 (acetylcholine, ACh) 수용체에 경쟁적인 길항제

(competitive antagonist)로서 뇌 내 시냅스의 아세틸콜린의 작용을 억제하여 인지기능 저하를 유도하는 물질이다. 발효더덕 추출물이 타크린과 유사하게 스코폴라민에 대하여 효과를 나타낸 것으로 보아 콜린 시스템 (cholinergic system)을 통하여 뇌 기능에 영향을 미쳤을 가능성을 생각해 볼 수 있다. 타크린을 포함하여 현재 치매 치료에 사용되고 있는 치매약은 대부분이 아세틸콜린에스테라아제 (acetylcholinesterase, AChE) 억제제이다. 치매에서 발견되는 β -amyloid plaques의 축적은 신경전달물질 및 관련 효소의 작용을 방해하여 인지기능 저하를 유발하는데, AChE 억제제는 아세틸콜린의 분해를 지연함으로써 인지기능 저하를 개선한다. 뇌 내 아세틸콜린 농도유지는 기억력과 지속주의력의 형성에 중요한 요소이므로 (Himmelheber et al., 2000), 발효더덕 추출물 또한 AChE 억제 기전을 통하여 주의력을 증가시켰을 수 있다. 또한 BDNF 분비는 아세틸콜린의 방출을 증가시키는 것으로 알려져 있으므로, 발효더덕 추출물 투여 후 증가한 BDNF가 아세틸콜린 분비로 이어졌을 수도 있다.

여러 인지기능 중에서도 주의력은 인지기능에 있어서 근본이 되는 중요한 인지 도메인이며, 주관적 인지 장애와 같이 초기 단계의 인지 저하에서부터 민감하게 변화하는 인지기능 지표이다. 발효더덕 추출물과 유사하게 주의력 도메인에 특이적으로 효과를 보인 선행물질인 갈란타민 (galantamine)의 연구 또한 참고해 볼 수 있겠다. 수선화 (daffodils)의 근경으로부터 추출된 천연물질인 갈란타민은 기존 치매 치료제의 AChE 억제 기전에 더하여 추가적으로 니코틴 아세틸콜린 수용체(nicotine acetylcholine receptor, nAChR) 부위에 결합함으로써 치매를 치료하는 두

가지 작용기전을 나타낸다 (Lilienfeld, 2002). nAChR 은 비선택적 양이온채널 (non-selective cation channel)로서 나트륨, 칼륨 등의 양이온을 통과시켜서 신경 신호를 전달하는데, 갈란타민은 nAChR 을 통하는 신경 신호를 증폭시키는 기전에도 관여하는 것으로 생각되고 있다. 이렇게 두 가지 작용기전을 갖는 갈란타민은 다른 치매 치료제와는 달리 특히 치매 환자의 주의력을 개선함으로써 일상 생활능력을 개선시키는 효과가 있는 것으로 보고되었다 (Wilcock et al., 2003; Vellas et al., 2005; Gorus et al., 2007; Galvin et al., 2008). 치매 환자를 대상으로 도네페질과 갈란타민의 효과를 비교한 인체적용시험 연구에서 도네페질 복용은 주의력을 개선시키지 않은 반면 갈란타민 복용은 주의력을 개선시켰다. 이러한 차별화된 주의력 개선은 갈란타민이 nAChR 에 결합하는 작용기전과 관련이 있을 것으로 유추된다 (Levin et al., 1998; Kadir et al., 2006). 본 연구의 발효더덕 추출물은 작업기억력은 향상시키지 않고 주의력만 향상시킨 것으로 관찰되었는데 갈란타민에서 특이적인 nAChR 결합 기전과 유사하게 인지기능에 영향을 미칠 가능성을 생각해 볼 수 있다. 또한 nAChR 은 뇌의 전두엽에 다수 분포되어 있는데 (Levin et al., 1998), 본 연구의 뇌영상 결과에서 전두엽 부위의 회백질 부피가 증가한 것이 이와 연관되어 있을 것으로 해석할 수 있겠다.

발효더덕 추출물의 주의력 증진 효과에 대한 또 다른 가능성 있는 기전으로는 장-뇌 축 이론이 있다. 사람의 장에는 10^{14} 개의 장 내 미생물이 존재하는데 이 중에서 유익균과 유해균의 균형이 숙주의 면역, 대사, 신경계 등에 관여한다는 여러 근거들이 보고되었다 (Bienenstock

et al., 2015). 장 내 미생물은 인체가 생산하지 못하는 일부 비타민을 생성하거나 영양소를 분해하여 인체에 공급하기도 하며, 생리대사의 신호전달체계에 관여하는 대사산물을 분비하기도 한다. 장 내 미생물이 없는 무균 동물을 이용한 실험이 관련 연구에서 많이 이용되어 왔는데, 자폐 행동을 보이는 무균 쥐에 건강한 쥐의 분변을 접종하여 정상적인 균형의 장 내 미생물을 이식하였더니 자폐 행동이 완화되었다는 실험 결과가 보고된 바 있다. 또한 무균 쥐에서 나타난 우울, 불안이나 인지기능 저하도 장 내 미생물 이식 후에 개선됨이 밝혀진 바 있다. 뿐만 아니라 장 내 미생물은 BDNF, GABA (γ -Aminobutyric acid), serotonin 등의 신경전달물질 분비를 촉진시킬 수 있었다. 일련의 실험 결과들은 장 내 미생물이 신경계에도 영향을 끼칠 수 있으며, 경구투여로 섭취한 식품이 뇌 기능을 변화시킬 수 있음을 시사한다.

본 연구에 사용된 발효더덕 추출물은 대표적인 유익균으로 알려진 *Bifidobacterium longums* 과 *Lactobacillus acidophilus* 라는 유산균을 이용하여 발효 과정을 거쳤다. 이 유산균들은 다른 발효식품들과 마찬가지로 더덕의 생리활성 물질을 증폭시켰을 수도 있고, 그 자체로 장 내 미생물 균형을 개선함으로써 장 내벽을 통해서 뇌 기능에 영향을 미쳤을 수도 있다. 데, 선행 전임상 연구에서 발효더덕 추출물을 투여 받은 생쥐의 해마에서 BDNF 가 증가한 것이 이와 관련되었을 가능성이 있다 (Weon et al., 2014). 더욱이 선행연구에서 더덕의 유효성분인 란세마사이드 A 는 장 내 미생물 대사에 의해서 에키노시스트산로 변화하며 란세마사이드 A 보다도 더 효과적으로 동물의 기억 손상을 억제하고 BDNF 및 pCREB 을 증가시키는 것으로 보고되었는데, 이는

유산균에 의해 발효된 더덕이 일반 더덕보다 그 기능성이 더욱 향상되고
인지기능 증진 효과를 증가시킬 수 있음을 시사하는 근거라 할 수
있겠다.

3. 발효더덕 추출물 경구투여에 따른 회백질 부피 변화

본 연구에서 발효더덕 추출물을 경구투여한 군은 위약대조군에 비해서 우측 하전두이랑과 좌측 중간전두이랑에서 회백질 부피가 증가한 것으로 관찰되었다. 이 두 군집은 전두엽 (frontal cortex)에 속하는 뇌 영역인데, 전두엽은 지능이나 여러 인지기능 검사 점수와 연관되어 있으며 특히 주의력 및 작업기억력을 포함한 실행능력을 담당하는 것으로 알려져 있다 (Alvarez et al., 2006).

첫 번째 군집인 우측 하전두이랑은 반응 억제 기능과 연관된 것으로 잘 알려져 있다 (Aron et al., 2004; Aron et al., 2014). 반응 억제는 맥락이나 목적에 맞는 반응을 하기 위해 자연적인 반응을 억제하고 목적 지향적인 반응을 할 수 있는 능력으로서 실행능력의 주요 도메인이다. 반응 억제를 성공적으로 수행하기 위해서는 어떤 자극에 집중을 하고 어떤 자극은 무시할 지 선택적으로 주의를 배정해야 하기 때문에 주의력과 매우 밀접한 기능이라 할 수 있다. 하전두이랑은 중요한 단서가 감지되었을 때 활성화되어 주의력을 조절하며, 여러 자극에 번갈아 가며 주의를 옮겨야 하는 주의 전환 능력 (attentional switching)과도 연관되어 있음이 알려져 있다 (Hampshire et al., 2006). 본 연구의 주의력 소검사 중 하나인 SST를 적용한 Hampshire 등의 기능적 뇌영상 연구에서 SST 과제를 수행할 때 우측 하전두이랑이 활성화되는 것이 보고되어, 해당 부위가 주의력에 대하여 구조적뿐만 아니라 기능적으로도 연관되어 있는 것으로 나타났다 (Hampshire et al., 2010). 젊은 성인 ADHD 군을 대상으로 한 최적화 복셀기반 형태분석

연구에서는 정상군에 비해 ADHD 군의 우측 하전두이랑 회백질 부피가 감소되어 있음을 보고하여 본 연구와 일관된 결과를 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Depue et al., 2010; Seidman et al., 2011).

두 번째 군집인 좌측 중간전두이랑의 특이적 기능에 대해서는 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았으나 관련된 몇 가지 연구들이 수행되었다. 중간전두이랑은 작업기억의 정보를 저장하고 처리하며 (Leung et al., 2002; Pessoa et al., 2002), 조건화 형성과 관련이 있다고 주장한 연구들이 있다 (Carter et al., 2006). 또한 좌측 중간전두이랑이 주의운동에 선행해서 뇌에서 관찰되는 전위인 운동준비성 (motor readiness)과 연관되어 있음을 주장한 연구도 있었다 (Pedersen et al., 1998). 우측 중간전두이랑의 절제술을 받은 환자를 대상으로 한 기능적 뇌영상 연구에서는 환자군의 우측 중간전두이랑의 기능적 연결성이 정상성인에 비해 저하되어 있으며 작업기억력과 주의력 조절을 요하는 과제를 할 때도 어려움을 겪는 것으로 나타났다 (Japee et al., 2015). 한편 좌측 중간전두이랑과 하전두이랑은 주의력 전환을 요하는 운동 선택 과제에서 활성화되기도 하였다 (Omori et al., 1999; Tamm et al., 2002). 일련의 연구들은 좌측 중간전두이랑이 주의력 조절과 연관되어 있을 가능성을 시사한다.

본 연구에서 발견된 뇌 영역에서 발달 단계에 따른 차별적 뇌 활성을 보고한 연구들도 있었다. Bunge 등의 기능적 뇌영상 연구에서 반응 억제 과제를 수행할 때 성인에서는 양측 중간전두이랑과 우측 하전두이랑이 활성화되었으나 아동에서는 해당 부위가 활성화 되지 않았다 (Bunge et al., 2002). 이와 유사하게 Adelman 등은 반응 억제 및

주의력을 요하는 스트룹 (stroop) 과제 수행 시, 아동이나 청소년군에 비해 젊은 성인에서 하전두이랑과 중간전두이랑의 활성이 증가하였음을 보고했다 (Adleman et al., 2002). 이들 연구에 따르면 주의력 과제를 수행할 때 활성화되는 뇌 부위는 나이에 따라 달라지며, 본 연구에서 변화한 것으로 보고된 뇌 부위는 아동이나 청소년보다는 젊은 성인에서 더 활성화되는 부위이다. 따라서 발효더덕 추출물의 뇌 기능 개선은 젊은 성인에서 더 효과적일 수 있으며 향후 연구의 타겟 연령층을 설정할 때 젊은 성인을 대상을 하는 것이 효율적인 결과를 도출할 수도 있다.

발효더덕 추출물 경구투여가 뇌 내 구조적 변화를 일으킨 구체적인 기전은 아직까지 알려져 있지 않으나, 전술한 바와 같이 유효성분에 의한 여러 신경전달물질 및 신경영양인자의 분비로 인해 뇌가소성이 촉진되었을 가능성을 생각해 볼 수 있다. BDNF 증가는 뇌의 시냅스 연결을 증가시켜 인지기능을 증진시키는 것으로 알려져 있다. 시냅스 연결 증가가 회백질 부피를 증가시켰을 수 있다. 또한 갈란타민의 주의력 증가 기전에 연관되어 있을 것으로 예상되는 nAChR 은 전두엽에 다수 분포되어 있는 것으로 보고되었다 (Levin et al., 1998). 만일 발효더덕 추출물이 nAChR 에 결합하는 기전을 통한다면 nAChR 이 많이 분포되어 있는 전두엽에서 특히 작용을 할 것이고 그에 따라 뇌 영역의 회백질 부피가 증가하였을 수 있겠다.

4. 연구의 장점 및 의의

발효더덕 추출물의 신경보호 효과는 세포실험 및 동물실험 연구에서 꾸준히 보고되어 왔으나 인체적용시험을 통해 사람에서의 뇌 기능 개선 효과가 밝혀진 바는 없었다. 본 연구에서는 사람에서도 발효더덕 추출물 경구투여로 인한 인지기능 증진 효과가 있음을 제시함으로써 발효더덕 추출물의 인지기능 개선제로서의 가능성과 안전성을 확인할 수 있었다. 또한 무작위, 이중맹검, 위약-대조, 전향적 중재 디자인으로 연구 진행하여 발효더덕 추출물 복용의 실제 효과에 대한 인과 여부를 파악할 수 있었다.

현재까지 인체적용시험을 통하여 다양한 인지기능 영역에 대한 개선 효과가 연구되었는데, 대부분의 연구는 노년층을 대상으로 하여 노화로 인한 기억력을 중재를 통해 개선하고자 하는 시도였다. 본 연구는 인지기능 중에서 비교적 적게 연구된 주의력에 대하여 탐구하였다. 주의력은 노년층뿐만 아니라 아동, 청소년층 및 젊은 성인층에서도 주목 받는 인지기능 영역으로서 주의력 요구가 점점 높아지는 사회적 상황에서 그 연구 필요성이 증가하고 있다. 또한 본 연구는 만 20-65세의 폭넓은 연령층을 대상을 적용 대상으로 하여 인지기능을 연구했다는 점에서 의의가 있다. 젊은 연령대는 노년층에 비해 상대적으로 뇌 기능이 가역적일 수 있으므로 발효더덕에 의한 인지기능 개선도 보다 효과적일 수 있다.

아울러 본 연구의 동물행동실험은 기존에 단 회 투여에 대해서만 연구된 결과에 더하여 2 주간의 비교적 장기적인 경구투여에 의해서도 동물의 인지기능 저하가 개선될 수 있음을 처음으로 보고하였다.

5. 연구의 한계 및 추후 연구 방향

본 연구는 만 20-65 세의 주관적 인지기능 저하를 호소하는 성인을 대상으로 하여 비교적 넓은 연령층을 대상으로 하였다. 이는 연구 결과를 넓은 범위에 적용할 수 있다는 장점이 될 수 있으나 한편으로는 연구 대상자 간에 실제 인지기능의 특성 및 생물학적 변화 기전이 균일하지 않을 수 있다는 단점이 될 수도 있다. 노화가 진행됨에 따라 주의력, 작업기억력, 실행능력 등이 가장 먼저 영향을 받는 것으로 알려져 있으므로 (Buckner, 2004) 각 연구 대상자의 나이에 따라서 주의력의 가역적 변화 가능성이 서로 다를 가능성을 배제할 수 없으며, 발효더덕 추출물 효과의 기전이 나이에 따라서 서로 다르게 작용할 수도 있다. 특히 주관적 기억 장애는 나이에 별로 원인이 다를 수 있고 개인이 호소하는 기준도 다를 수 있으므로 정밀하고 객관적인 진단으로 균일한 연구 대상자가 모집되었다고는 하기 어렵다. 기저시점 비교에서 세 군간에 평균 나이에서 유의한 차이는 관찰되지 않았으나 연구 표본 수가 각 군당 20 명으로 비교적 적은 편이어서 일부의 젊은 연령의 연구 대상자에 의해서 영향을 받았을 수 있다. 추후 연구에서는 청소년군, 젊은 성인군, 정밀한 진단평가에 따른 퇴행성 뇌질환 위험군 등과 같이 연구 대상자의 연령이나 특성을 보다 특정하여 진행하는 것이 임상적으로 의미 있을 것으로 판단된다.

인체적용시험의 연구 대상자는 광고를 보고 연락한 사람 중에서 선별되었다. 이러한 모집 방법은 평균 집단에 비해 뇌 건강에 관심이 높고 동기가 있는 사람으로 편향되었을 가능성을 포함한다. 또한

인체시험에 영향을 줄 수 있는 약물의 섭취는 금하였으나, 중재 방법이 효과크기가 작은 식품의 섭취이고 8 주라는 비교적 짧은 시간 동안 경구투여를 하였기 때문에 식이요법에 의한 교란효과를 통제하지 못했을 수 있다.

한편 본 연구에서 발효더덕 추출물 복용 후 작업기억력에는 변화가 관찰되지 않았다. 다만 발효더덕 투여군 전체에 대한 분석에서는 위약대조군보다 작업기억력이 다소 증가하는 경향을 보였다. 이전 연구들이 대부분 최소 12 주 이상의 기간 동안 수행된 것에 비추어 볼 때 (Macready et al., 2010) 본 연구는 8 주라는 비교적 짧은 시간 동안 수행 되었다고 할 수 있다. 또한 이 연구에서 발효더덕 추출물의 용량에 따른 주의력 개선 효과의 차이는 관찰되지 않은 점으로 미루어, 적절한 용량이 설정되지 않았을 수 있다. 발효더덕 추출물의 효과는 인간에서 연구된 바가 없으므로 동물실험에서 보고된 유효 용량을 토대로 효과가 있으면서 안전성에는 문제가 없을 것으로 기대되는 용량을 추정하여 시험약을 제조하였다. 따라서 용량의 천장효과 (ceiling effect)로 인해 용량 의존성을 탐지하지 못하였을 가능성이 있다. 후속 연구에서는 용량을 상향 조정하거나 투여 기간을 연장함으로써 최적 용량을 탐색하고 다른 영역의 인지기능에서도 효과를 보이는지 확인이 필요하겠다. 단 이를 위해서는 발효더덕 추출물 투여가 인지기능을 증진시키는 기전이 무엇인지, 목적에 따른 최적의 원료와 추출, 가공 방법은 무엇인지, 장기적으로 복용하였을 때 안전한지 등에 대한 고려가 필요할 것이다.

본 연구에서 동물행동실험은 Y-미로 실험에서만 수행되었다. 발효더덕 추출물의 주의력 개선 효과 결과를 참고하여 추후 보다 다양하고 깊이 있는 동물행동실험 및 기전 탐구를 수행할 수 있을 것으로 기대한다. 스코폴라민에 의한 기억 손상을 회복시킨 결과에 따르면 발효더덕 추출물의 장기복용은 콜린 시스템과 관련되어 있을 수 있다. 또한 주의력이 특이적으로 향상된 점은 갈란타민의 nAChR 기전을 참고할 수 있겠다. 한편 장-뇌 축의 작동 기전에 의한 기전도 고려해 볼 수 있다. 향후 연구에서는 이러한 여러 방향을 참고하여 발효더덕 추출물의 효과 및 기전을 연구하는 것이 필요하겠다.

마지막으로 본 연구에서 동물행동실험은 예방적 디자인인 반면 인체적용시험은 주관적 인지 장애군에서 인지기능 증진 효과를 확인하는 디자인이므로 서로 동일한 측정치를 얻은 병행 디자인으로 해석할 수 없다는 한계점이 있다. 향후 동물실험에서는 경미한 인지 저하를 유도한 후 발효더덕 추출물에 의한 개선 효과를 탐구한다면 인지기능 개선제로서 인체에서의 효과와 기전을 탐구하는 데 보다 도움이 될 것이다.

참 고 문 헌

- Adleman NE, V Menon, CM Blasey, CD White, IS Warsofsky, et al. (2002).
"A Developmental fMRI Study of the Stroop Color-Word Task."
NeuroImage **16**(1): 61-75.
- Alvarez JA and E Emory (2006). "Executive Function and the Frontal
Lobes: A Meta-Analytic Review." *Neuropsychology Review* **16**(1):
17-42.
- Ano Y, M Ozawa, T Kutsukake, S Sugiyama, K Uchida, et al. (2015).
"Preventive effects of a fermented dairy product against
Alzheimer's disease and identification of a novel oleamide with
enhanced microglial phagocytosis and anti-inflammatory activity."
PLoS One **10**(3): e0118512.
- Aron AR, TW Robbins and RA Poldrack (2004). "Inhibition and the right
inferior frontal cortex." *Trends in Cognitive Sciences* **8**(4): 170-177.
- Aron AR, TW Robbins and RA Poldrack (2014). "Inhibition and the right
inferior frontal cortex: one decade on." *Trends in Cognitive
Sciences* **18**(4): 177-185.
- Aruoma OI, Y Hayashi, F Marotta, P Mantello, E Rachmilewitz, et al.
(2010). "Applications and bioefficacy of the functional food
supplement fermented papaya preparation." *Toxicology* **278**(1): 6-
16.
- Ashburner J and KJ Friston (2000). "Voxel-Based Morphometry—The
Methods." *NeuroImage* **11**(6): 805-821.
- Baddeley A (2000). "The episodic buffer: a new component of working

- memory?" *Trends in Cognitive Sciences* **4**(11): 417-423.
- Baddeley A (2012). "Working Memory: Theories, Models, and Controversies." *Annual Review of Psychology* **63**(1): 1-29.
- Banerjee S, SC Smith, DL Lamping, RH Harwood, B Foley, et al. (2006). "Quality of life in dementia: more than just cognition. An analysis of associations with quality of life in dementia." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **77**(2): 146-148.
- Barbagallo M, M Belvedere, A Di Prima, S Miraglia and LJ Dominguez (2013). "Effects of fermented papaya powder on oxidative stress in Alzheimer disease." *Giornale di Gerontologia* **61**(4): 199-204.
- Barbagallo M, F Marotta and LJ Dominguez (2015). "Oxidative stress in patients with Alzheimer's disease: effect of extracts of fermented papaya powder." *Mediators Inflamm* **2015**: 624801.
- Bell L, DJ Lamport, LT Butler and CM Williams (2015). "A Review of the Cognitive Effects Observed in Humans Following Acute Supplementation with Flavonoids, and Their Associated Mechanisms of Action." *Nutrients* **7**(12): 10290-10306.
- Belleville S, H Chertkow and S Gauthier (2007). "Working memory and control of attention in persons with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment." *Neuropsychology* **21**(4): 458-469.
- Bensalem J, A Dal-Pan, E Gillard, F Calon and V Pallet (2015). "Protective effects of berry polyphenols against age-related cognitive impairment." *Nutrition and Aging* **3**: 89-106.
- Bienenstock J, W Kunze and P Forsythe (2015). "Microbiota and the gut-brain axis." *Nutrition Reviews* **73**(suppl 1): 28-31.
- Boespflug EL, RK McNamara, JC Eliassen, MD Schidler and R Krikorian

- (2016). "Fish Oil Supplementation Increases Event-Related Posterior Cingulate Activation in Older Adults with Subjective Memory Impairment." *J Nutr Health Aging* **20**(2): 161-169.
- Buckner RL (2004). "Memory and Executive Function in Aging and AD: Multiple Factors that Cause Decline and Reserve Factors that Compensate." *Neuron* **44**(1): 195-208.
- Bunge SA, NM Dudukovic, ME Thomason, CJ Vaidya and JDE Gabrieli (2002). "Immature Frontal Lobe Contributions to Cognitive Control in Children: Evidence from fMRI." *Neuron* **33**(2): 301-311.
- Carter RM, JP O'Doherty, B Seymour, C Koch and RJ Dolan (2006). "Contingency awareness in human aversive conditioning involves the middle frontal gyrus." *NeuroImage* **29**(3): 1007-1012.
- Choi YJ, HS Yang, JH Jo, SC Lee, TY Park, et al. (2015). "Anti-Amnesic Effect of Fermented *Ganoderma lucidum* Water Extracts by Lactic Acid Bacteria on Scopolamine-Induced Memory Impairment in Rats." *Prev Nutr Food Sci* **20**(2): 126-132.
- Cowan N, NM Fristoe, EM Elliott, RP Brunner and JS Sauls (2006). "Scope of attention, control of attention, and intelligence in children and adults." *Memory & Cognition* **34**(8): 1754-1768.
- Wechsler D (1997). "WAIS-III, wechsler adult intelligence scale: Administration and scoring manual: Psychological Corporation."
- Dauncey MJ (2009). "New insights into nutrition and cognitive neuroscience: Symposium on 'Early nutrition and later disease: current concepts, research and implications'." *Proceedings of the Nutrition Society* **68**(4): 408-415.
- Depue BE, GC Burgess, LC Bidwell, EG Willcutt and MT Banich (2010).

- "Behavioral performance predicts grey matter reductions in the right inferior frontal gyrus in young adults with combined type ADHD." *Psychiatry Research: Neuroimaging* **182**(3): 231-237.
- Dye L and J Blundell (2002). "Functional foods: psychological and behavioural functions." *British Journal of Nutrition* **88**(S2): S187-S211.
- Elfgrén C, L Gustafson, S Vestberg and U Passant (2010). "Subjective memory complaints, neuropsychological performance and psychiatric variables in memory clinic attendees: A 3-year follow-up study." *Archives of Gerontology and Geriatrics* **51**(3): e110-e114.
- Francis G, Z Kerem, HP Makkar and K Becker (2002). "The biological action of saponins in animal systems: a review." *Br J Nutr* **88**(6): 587-605.
- Fukuda K and EK Vogel (2009). "Human variation in overriding attentional capture." *J Neurosci* **29**(27): 8726-8733.
- Galvin JE, B Cornblatt, P Newhouse, S Ancoli-Israel, K Wesnes, et al. (2008). "Effects of Galantamine on Measures of Attention: Results From 2 Clinical Trials in Alzheimer Disease Patients With Comparisons to Donepezil." *Alzheimer Disease & Associated Disorders* **22**(1): 30-38.
- Gavrilova SI, UW Preuss, JW Wong, R Hoerr, R Kaschel, et al. (2014). "Efficacy and safety of Ginkgo biloba extract EGb 761 in mild cognitive impairment with neuropsychiatric symptoms: a randomized, placebo-controlled, double-blind, multi-center trial." *Int J Geriatr Psychiatry* **29**(10): 1087-1095.

- Go J, JE Kim, MH Kwak, EK Koh, SH Song, et al. (2015). "Neuroprotective effects of fermented soybean products (Cheonggukjang) manufactured by mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383 on trimethyltin-induced cognitive defects mice." *Nutr Neurosci*.
- Gómez-Pinilla F (2008). "Brain foods: the effects of nutrients on brain function." *Nature reviews. Neuroscience* **9**(7): 568-578.
- Good CD, IS Johnsrude, J Ashburner, RNA Henson, KJ Friston, et al. (2001). "A Voxel-Based Morphometric Study of Ageing in 465 Normal Adult Human Brains." *NeuroImage* **14**(1): 21-36.
- Gorus E, M Lambert, R De Raedt and T Mets (2007). "The Influence of Galantamine on Reaction Time, Attention Processes, and Performance Variability in Elderly Alzheimer Patients." *Journal of Clinical Psychopharmacology* **27**(2): 182-187.
- Greenwood PM, T Sunderland, JL Friz and R Parasuraman (2000). "Genetics and visual attention: selective deficits in healthy adult carriers of the epsilon 4 allele of the apolipoprotein E gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(21): 11661-11666.
- GrÉGoire J and M Van der Linden (1997). "Effect of age on forward and backward digit spans." *Aging, Neuropsychology, and Cognition* **4**(2): 140-149.
- Griffin ÉW, S Mullally, C Foley, SA Warmington, SM O'Mara, et al. (2011). "Aerobic exercise improves hippocampal function and increases BDNF in the serum of young adult males." *Physiology & Behavior* **104**(5): 934-941.
- Hahn B, M Shoaib and I Stolerman (2002). "Nicotine-induced enhancement

- of attention in the five-choice serial reaction time task: the influence of task demands." *Psychopharmacology* **162**(2): 129-137.
- Halperin JM and DM Healey (2011). "The influences of environmental enrichment, cognitive enhancement, and physical exercise on brain development: Can we alter the developmental trajectory of ADHD?" *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **35**(3): 621-634.
- Hamilton M (1960). "A rating scale for depression." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **23**(1): 56-62.
- Hamilton MAX (1959). "THE ASSESSMENT OF ANXIETY STATES BY RATING." *British Journal of Medical Psychology* **32**(1): 50-55.
- Hampshire A, SR Chamberlain, MM Monti, J Duncan and AM Owen (2010). "The role of the right inferior frontal gyrus: inhibition and attentional control." *NeuroImage* **50**(3): 1313-1319.
- Hampshire A and AM Owen (2006). "Fractionating attentional control using event-related fMRI." *Cerebral Cortex* **16**(12): 1679-1689.
- He X, Y Zou, WB Yoon, SJ Park, DS Park, et al. (2011). "Effects of probiotic fermentation on the enhancement of biological and pharmacological activities of *Codonopsis lanceolata* extracted by high pressure treatment." *J Biosci Bioeng* **112**(2): 188-193.
- Hedden T and JDE Gabrieli (2004). "Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience." *Nat Rev Neurosci* **5**(2): 87-96.
- Hermawati E, DC Sari and G Partadiredja (2015). "The effects of black garlic ethanol extract on the spatial memory and estimated total number of pyramidal cells of the hippocampus of monosodium glutamate-exposed adolescent male Wistar rats." *Anat Sci Int*

90(4): 275-286.

Hertzog C, RA Dixon, DF Hultsch and SWS MacDonald (2003). "Latent Change Models of Adult Cognition: Are Changes in Processing Speed and Working Memory Associated With Changes in Episodic Memory?" *Psychology and Aging* **18**(4): 755-769.

Himmelheber AM, M Sarter and JP Bruno (2000). "Increases in cortical acetylcholine release during sustained attention performance in rats." *Cognitive Brain Research* **9**(3): 313-325.

Hogervorst E, T Sadjimim, A Yesufu, P Kreager and TB Rahardjo (2008). "High tofu intake is associated with worse memory in elderly Indonesian men and women." *Dement Geriatr Cogn Disord* **26**(1): 50-57.

Hossen MJ, MY Kim, JH Kim and JY Cho (2016). "Codonopsis lanceolata: A Review of Its Therapeutic Potentials." *Phytother Res* **30**(3): 347-356.

Husain M and MA Mehta (2011). "Cognitive enhancement by drugs in health and disease." *Trends in Cognitive Sciences* **15**(1): 28-36.

Hwang C-R, S-H Oh, H-Y Kim, S-H Lee, I-G Hwang, et al. (2011). "Chemical composition and antioxidant activity of Deoduk (Codonopsis lanceolata) and Doragi (Platycodon grandiflorum) according to temperature." *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* **40**(6): 798-803.

Imao K, T Kameyama and M Ukai (2001). "PS-501, fermented papaya preparation, improves scopolamine-induced amnesia in mice." *Research Communications in Pharmacology and Toxicology* **6**(3-4): 197-204.

- Fray PJ, Robbins TW, Sahakian BJ (1996). "Neuropsychiatric applications of CANTAB." *International Journal of Geriatric Psychiatry* **11**(4): 329-336.
- Japee S, K Holiday, MD Satyshur, I Mukai and LG Ungerleider (2015). "A role of right middle frontal gyrus in reorienting of attention: a case study." *Frontiers in Systems Neuroscience* **9**(23).
- Jeon Y, B Kim, JE Kim, BR Kim, S Ban, et al. (2016). "Effects of Ganglioside on Working Memory and the Default Mode Network in Individuals with Subjective Cognitive Impairment: A Randomized Controlled Trial." *Am J Chin Med* **44**(3): 489-514.
- Joh E-H and D-H Kim (2010). "Lancemaside A inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by targeting LPS/TLR4 complex." *Journal of Cellular Biochemistry* **111**(4): 865-871.
- Johnson IT, JM Gee, K Price, C Curl and GR Fenwick (1986). "Influence of saponins on gut permeability and active nutrient transport in vitro." *J Nutr* **116**(11): 2270-2277.
- Jung IH, SE Jang, EH Joh, J Chung, MJ Han, et al. (2012). "Lancemaside A isolated from *Codonopsis lanceolata* and its metabolite echinocystic acid ameliorate scopolamine-induced memory and learning deficits in mice." *Phytomedicine* **20**(1): 84-88.
- Jung IH, MA Jung, EJ Kim, MJ Han and DH Kim (2012). "Lactobacillus pentosus var. plantarum C29 protects scopolamine-induced memory deficit in mice." *J Appl Microbiol* **113**(6): 1498-1506.
- Kadir A, O Almkvist, A Wall, B Långström and A Nordberg (2006). "PET imaging of cortical 11C-nicotine binding correlates with the cognitive function of attention in Alzheimer's disease."

Psychopharmacology **188**(4): 509-520.

Kalmijn S, MP van Boxtel, M Ocke, WM Verschuren, D Kromhout, et al.

(2004). "Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age." *Neurology* **62**(2): 275-280.

Kanouchi H, T Kakimoto, H Nakano, M Suzuki, Y Nakai, et al. (2016). "The

Brewed Rice Vinegar Kurozu Increases HSPA1A Expression and Ameliorates Cognitive Dysfunction in Aged P8 Mice." *PLoS One*

11(3): e0150796.

Kato-Kataoka A, K Nishida, M Takada, K Suda, M Kawai, et al. (2016).

"Fermented milk containing *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents the onset of physical symptoms in medical students under academic examination stress." *Beneficial Microbes* **7**(2): 153-156.

Kean RJ, DJ Lamport, GF Dodd, JE Freeman, CM Williams, et al. (2015).

"Chronic consumption of flavanone-rich orange juice is associated with cognitive benefits: an 8-wk, randomized, double-blind, placebo-controlled trial in healthy older adults." *Am J Clin Nutr* **101**(3): 506-514.

Kim E, WS Yang, JH Kim, JG Park, HG Kim, et al. (2014). "Lancemaside A

from *Codonopsis lanceolata* modulates the inflammatory responses mediated by monocytes and macrophages." *Mediators Inflamm* **2014**: 405158.

Kim J, SH Kim, DS Lee, DJ Lee, SH Kim, et al. (2013). "Effects of

fermented ginseng on memory impairment and beta-amyloid reduction in Alzheimer's disease experimental models." *J Ginseng Res* **37**(1): 100-107.

- Krikorian R, EL Boespflug, DE Fleck, AL Stein, JD Wightman, et al. (2012). "Concord grape juice supplementation and neurocognitive function in human aging." *J Agric Food Chem* **60**(23): 5736-5742.
- Lee BH, BY Ho, CT Wang and TM Pan (2009). "Red mold rice promoted antioxidase activity against oxidative injury and improved the memory ability of zinc-deficient rats." *J Agric Food Chem* **57**(22): 10600-10607.
- Lee CL, TF Kuo, JJ Wang and TM Pan (2007). "Red mold rice ameliorates impairment of memory and learning ability in intracerebroventricular amyloid beta-infused rat by repressing amyloid beta accumulation." *J Neurosci Res* **85**(14): 3171-3182.
- Lee CL, TF Kuo, CL Wu, JJ Wang and TM Pan (2010). "Red mold rice promotes neuroprotective sAPPalpha secretion instead of Alzheimer's risk factors and amyloid beta expression in hyperlipidemic Abeta40-infused rats." *J Agric Food Chem* **58**(4): 2230-2238.
- Lee CL, JJ Wang and TM Pan (2008). "Red mold rice extract represses amyloid beta peptide-induced neurotoxicity via potent synergism of anti-inflammatory and antioxidative effect." *Appl Microbiol Biotechnol* **79**(5): 829-841.
- Lee ES (2015). "A Flood of Health Functional Foods: What Is to Be Recommended?" *J Menopausal Med* **21**(1): 12-18.
- Lee J-H, J-H Lee and J-S Jin (2012). "Fermentation of traditional medicine: present and future." *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine* **12**(3): 163-165.
- Leung HC, JC Gore and PS Goldman-Rakic (2002). "Sustained Mnemonic

- Response in the Human Middle Frontal Gyrus during On-Line Storage of Spatial Memoranda." *Journal of Cognitive Neuroscience* **14**(4): 659-671.
- Levin ED and BB Simon (1998). "Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals." *Psychopharmacology* **138**(3): 217-230.
- Lilienfeld S (2002). "Galantamine — a Novel Cholinergic Drug with a Unique Dual Mode of Action for the Treatment of Patients with Alzheimer's Disease." *CNS Drug Reviews* **8**(2): 159-176.
- Lingjærde O, UG Ahlfors, P Bech, SJ Dencker and K Elgen (1987). "The UKU side effect rating scale: A new comprehensive rating scale for psychotropic drugs and a cross-sectional study of side effects in neuroleptic-treated patients." *Acta Psychiatrica Scandinavica* **76**: 1-100.
- Liu TH, J Chiou and TY Tsai (2016). "Effects of Lactobacillus plantarum TWK10-Fermented Soymilk on Deoxycorticosterone Acetate-Salt-Induced Hypertension and Associated Dementia in Rats." *Nutrients* **8**(5).
- Logan GD and WB Cowan (1984). "On the ability to inhibit thought and action: A theory of an act of control." *Psychological Review* **91**(3): 295-327.
- Macready AL, LT Butler, OB Kennedy, JA Ellis, CM Williams, et al. (2010). "Cognitive tests used in chronic adult human randomised controlled trial micronutrient and phytochemical intervention studies." *Nutrition Research Reviews* **23**(2): 200-229.
- Mastroiacovo D, C Kwik-Urbe, D Grassi, S Necozone, A Raffaele, et al.

- (2015). "Cocoa flavanol consumption improves cognitive function, blood pressure control, and metabolic profile in elderly subjects: the Cocoa, Cognition, and Aging (CoCoA) Study--a randomized controlled trial." *Am J Clin Nutr* **101**(3): 538-548.
- McDowd JM (2007). "An Overview of Attention: Behavior and Brain." *Journal of Neurologic Physical Therapy* **31**(3): 98-103.
- Morley JE (2014). "Cognition and nutrition." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **17**(1): 1-4.
- Newson RS and EB Kemps (2006). "The nature of subjective cognitive complaints of older adults." *Int J Aging Hum Dev* **63**(2): 139-151.
- Ng TP, L Feng, M Niti, EH Kua and KB Yap (2008). "Tea consumption and cognitive impairment and decline in older Chinese adults." *Am J Clin Nutr* **88**(1): 224-231.
- Ohsawa K, N Uchida, K Ohki, Y Nakamura and H Yokogoshi (2015). "Lactobacillus helveticus-fermented milk improves learning and memory in mice." *Nutr Neurosci* **18**(5): 232-240.
- Omori M, H Yamada, T Murata, N Sadato, M Tanaka, et al. (1999). "Neuronal substrates participating in attentional set-shifting of rules for visually guided motor selection: A functional magnetic resonance imaging investigation." *Neuroscience Research* **33**(4): 317-323.
- Park SK, IC Jung, WK Lee, YS Lee, HK Park, et al. (2011). "A combination of green tea extract and l-theanine improves memory and attention in subjects with mild cognitive impairment: a double-blind placebo-controlled study." *J Med Food* **14**(4): 334-343.
- Pedersen JR, P Johannsen, CK Bak, B Kofoed, K Saermark, et al. (1998).

- "Origin of Human Motor Readiness Field Linked to Left Middle Frontal Gyrus by MEG and PET." *NeuroImage* **8**(2): 214-220.
- Pessoa L, E Gutierrez, P Bandettini and L Ungerleider (2002). "Neural correlates of visual working memory: fMRI amplitude predicts task performance." *Neuron* **35**(5): 975-987.
- Rao AV and DM Gurfinkel (2000). "The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides." *Drug Metabol Drug Interact* **17**(1-4): 211-235.
- Reay JL, AB Scholey and DO Kennedy (2010). "Panax ginseng (G115) improves aspects of working memory performance and subjective ratings of calmness in healthy young adults." *Hum Psychopharmacol* **25**(6): 462-471.
- Reisberg B and S Gauthier (2008). "Current evidence for subjective cognitive impairment (SCI) as the pre-mild cognitive impairment (MCI) stage of subsequently manifest Alzheimer's disease." *International Psychogeriatrics* **20**(1): 1-16.
- Reisberg B, L Prichep, L Mosconi, ER John, L Glodzik-Sobanska, et al. (2008). "The pre-mild cognitive impairment, subjective cognitive impairment stage of Alzheimer's disease." *Alzheimer's & Dementia* **4**(1, Supplement 1): S98-S108.
- Reisberg B, MB Shulman, C Torossian, L Leng and W Zhu (2010). "Outcome over seven years of healthy adults with and without subjective cognitive impairment." *Alzheimer's & Dementia* **6**(1): 11-24.
- Remington R, JJ Lortie, H Hoffmann, R Page, C Morrell, et al. (2015). "A Nutritional Formulation for Cognitive Performance in Mild

- Cognitive Impairment: A Placebo-Controlled Trial with an Open-Label Extension." *J Alzheimers Dis* **48**(3): 591-595.
- Rita Cardoso B, D Apolinario, V da Silva Bandeira, AL Busse, RM Magaldi, et al. (2016). "Effects of Brazil nut consumption on selenium status and cognitive performance in older adults with mild cognitive impairment: a randomized controlled pilot trial." *Eur J Nutr* **55**(1): 107-116.
- Rodda J, T Dannhauser, DJ Cutinha, SS Shergill and Z Walker (2011). "Subjective cognitive impairment: Functional MRI during a divided attention task." *European Psychiatry* **26**(7): 457-462.
- Ryan JJ, SJ Lopez and AM Paolo (1996). "Digit span performance of persons 75–96 years of age: Base rates and associations with selected demographic variables." *Psychological assessment* **8**(3): 324.
- Ryu H-S (2008). "Effects of Codonopsis lanceolata extracts on mouse immune cell activation." *The Korean Journal of Food And Nutrition* **21**(3): 263-268.
- Sahakian B, G Jones, R Levy, J Gray and D Warburton (1989). "The effects of nicotine on attention, information processing, and short-term memory in patients with dementia of the Alzheimer type." *The British Journal of Psychiatry* **154**(6): 797-800.
- Saunders NLJ and MJ Summers (2010). "Attention and working memory deficits in mild cognitive impairment." *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* **32**(4): 350-357.
- Seidman LJ, J Biederman, L Liang, EM Valera, MC Monuteaux, et al. (2011). "Gray Matter Alterations in Adults with Attention-

- Deficit/Hyperactivity Disorder Identified by Voxel Based Morphometry." *Biological Psychiatry* **69**(9): 857-866.
- Sekirov I, SL Russell, LCM Antunes and BB Finlay (2010). "Gut Microbiota in Health and Disease." *Physiological Reviews* **90**(3): 859-904.
- Slavin MJ, H Brodaty, NA Kochan, JD Crawford, JN Trollor, et al. (2010). "Prevalence and Predictors of "Subjective Cognitive Complaints" in the Sydney Memory and Ageing Study." *The American Journal of Geriatric Psychiatry* **18**(8): 701-710.
- Song C-H, Y-C Seo, W-Y Choi, C-G Lee, D-U Kim, et al. (2012). "Enhancement of antioxidative activity of *Codonopsis lanceolata* by stepwise steaming process." *Korean Journal of Medicinal Crop Science* **20**(4): 238-244.
- Stewart R (2012). "Subjective cognitive impairment." *Current Opinion in Psychiatry* **25**(6): 445-450.
- Tamm L, V Menon and AL Reiss (2002). "Maturation of Brain Function Associated With Response Inhibition." *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* **41**(10): 1231-1238.
- Tseng WT, YW Hsu and TM Pan (2016). "The ameliorative effect of *Monascus purpureus* NTU 568-fermented rice extracts on 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells and the rat model of Parkinson's disease." *Food Funct* **7**(2): 752-762.
- Vaurio RG, DJ Simmonds and SH Mostofsky (2009). "Increased intra-individual reaction time variability in attention-deficit/hyperactivity disorder across response inhibition tasks with different cognitive demands." *Neuropsychologia* **47**(12): 2389-2396.
- Vauzour D (2012). "Dietary Polyphenols as Modulators of Brain Functions:

Biological Actions and Molecular Mechanisms Underpinning Their Beneficial Effects." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2012**: 16.

Vauzour D, A Rodriguez-Mateos, G Corona, MJ Oruna-Concha and JPE Spencer (2010). "Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action." *Nutrients* **2**(11): 1106.

Vellas B, L Cunha, H-J Gertz, PPD Deyn, K Wesnes, et al. (2005). "Early onset effects of galantamine treatment on attention in patients with Alzheimer's disease." *Current Medical Research and Opinion* **21**(9): 1423-1429.

Wang H-Y, L-W Qi, C-Z Wang and P Li (2011). "Bioactivity Enhancement of Herbal Supplements by Intestinal Microbiota Focusing on Ginsenosides." *The American Journal of Chinese Medicine* **39**(06): 1103-1115.

Weon JB, B Lee, BR Yun, J Lee, HY Lee, et al. (2013). "Memory enhancing effect of *Codonopsis lanceolata* by high hydrostatic pressure process and fermentation." *Korean Journal of Pharmacognosy* **44**(1): 41-46.

Weon JB, BR Yun, J Lee, MR Eom, JS Kim, et al. (2013). "The Ameliorating Effect of Steamed and Fermented *Codonopsis lanceolata* on Scopolamine-Induced Memory Impairment in Mice." *Evid Based Complement Alternat Med* **2013**: 464576.

Weon JB, BR Yun, J Lee, MR Eom, HJ Ko, et al. (2014). "Cognitive-Enhancing Effect of Steamed and Fermented *Codonopsis lanceolata*: A Behavioral and Biochemical Study." *Evid Based Complement Alternat Med* **2014**: 319436.

- Weon JB, BR Yun, J Lee, MR Eom, HJ Ko, et al. (2014). "Neuroprotective Effect of Steamed and Fermented *Codonopsis lanceolata*." *Biomol Ther (Seoul)* **22**(3): 246-253.
- Wesnes KA, T Ward, A McGinty and O Petrini (2000). "The memory enhancing effects of a Ginkgo biloba/Panax ginseng combination in healthy middle-aged volunteers." *Psychopharmacology (Berl)* **152**(4): 353-361.
- Wilcock G, I Howe, H Coles, S Lilienfeld, L Truyen, et al. (2003). "A Long-Term Comparison of Galantamine and Donepezil in the Treatment of Alzheimer's Disease." *Drugs & Aging* **20**(10): 777-789.
- Yang EJ, SI Kim, SY Park, HY Bang, JH Jeong, et al. (2012). "Fermentation enhances the in vitro antioxidative effect of onion (*Allium cepa*) via an increase in quercetin content." *Food Chem Toxicol* **50**(6): 2042-2048.
- Yoo DH and DH Kim (2015). "Lactobacillus pentosus var. plantarum C29 increases the protective effect of soybean against scopolamine-induced memory impairment in mice." *Int J Food Sci Nutr* **66**(8): 912-918.
- Zhang J, A Mori, Q Chen and B Zhao (2006). "Fermented papaya preparation attenuates beta-amyloid precursor protein: beta-amyloid-mediated copper neurotoxicity in beta-amyloid precursor protein and beta-amyloid precursor protein Swedish mutation overexpressing SH-SY5Y cells." *Neuroscience* **143**(1): 63-72.

Abstract

Effects of Fermented *Codonopsis lanceolata* extract on Cognitive Function

Binna Kim

Interdisciplinary Program in Neuroscience

College of Natural Sciences

Seoul National University

Introduction: Use of functional foods to enhance cognitive functions has received increasing attention in recent years. Fermented *Codonopsis lanceolata* is a plant-based functional food, which is suggested to show improved biological activities and antioxidative effects through the fermentation process. Evidence from *in vitro* and animal data indicates that fermented *Codonopsis lanceolata* has neuroprotective effects and may improve cognitive function. However, no studies have been conducted in humans to elucidate the cognitive-enhancing effects of fermented *Codonopsis lanceolata*. This study aims to examine the efficacy of oral administration of fermented *Codonopsis lanceolata* on cognitive function in mice as well as in humans.

Methods: For the animal study, ICR male mice were orally administered with distilled water, tacrine, or fermented *Codonopsis lanceolata* (800 mg/kg body weight) for 2 weeks after a 1-week adaptation period. Two

weeks later, memory deficit was induced by scopolamine 30 minutes prior to testing. Cognitive function was evaluated with spontaneous alteration in the Y-maze test.

In the clinical trial, a total of 60 individuals participated in a randomized, double-blind, placebo-controlled 8-week trial. Participants were allocated to either the fermented *Codonopsis lanceolata* groups (high-dose: 1050 mg/day, n=20 or low-dose: 525 mg/day, n=20) or the placebo group (n=20) at the baseline visit. The primary outcome measures were the attention composite z-score and working memory composite z-score, which were calculated based on performance in a series of cognitive tasks including letter-number sequencing, digit span, and several tests from the Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB). Cognitive tasks and clinical interviews were conducted at Baseline and Week 8. Laboratory monitoring and adverse event rating for safety assessment was conducted at Baseline, Week 4, and Week 8. Also, as an exploratory outcome, changes in gray matter volume were assessed by voxel-based morphometry of high-resolution T1-weighted magnetic resonance images.

Results: In the animal study, spontaneous alteration were 55.4% (standard error of the mean [SEM] 1.5), 29.3% (SEM 4.9), 46.2% (SEM 2.5), 44.6% (SEM 3.9) in the control, scopolamine, tacrine, and fermented *Codonopsis lanceolata* group, respectively. Two-week pretreatment with fermented *Codonopsis lanceolata* significantly reduced scopolamine-induced memory impairment (15.3%, $p=0.03$). The performance of the fermented *Codonopsis lanceolata*-treated group was similar to that of the tacrine-treated group.

In the clinical trial, there were no sociodemographic or clinical differences between the three groups at baseline. After 8-week administration, both the high-dose group ($z=2.18$, p for interaction= 0.03) and the low-dose group ($z=2.10$, p for interaction= 0.04) of fermented *Codonopsis lanceolata* showed significant improvement in attention, compared with the placebo group. There was no significant difference between the attention performance of the high-dose group and that of the low-dose group, indicating the absence of dose-response relationship ($z=0.05$, p for interaction= 0.96). In within-group analyses, the fermented *Codonopsis lanceolata* group showed attention enhancement over time (high-dose, $z=4.26$, p for time effect <0.01 ; low-dose, $z=4.07$, p for time effect <0.01), while the placebo group did not ($z=1.18$, p for time effect= 0.24). However, working memory performance did not change over time in all three groups (high-dose, $z=1.38$, p for time effect= 0.17 ; low-dose, $z=1.27$, p for time effect= 0.20 ; placebo, $z=0.23$, p for time effect= 0.81). There was no significant difference between the three groups in working memory improvement (high-dose, $z=0.83$, p for interaction= 0.41 ; low-dose, $z=0.75$, p for interaction= 0.45). No evidence of serious adverse events was observed.

Voxel-based morphometry showed significant gray matter volume increase in the following brain regions in the fermented *Codonopsis lanceolata* group compared to the placebo group, at corrected $p<0.05$: left frontal lobe [(x, y, z) = ($-28, 58, 6$), cluster size = 1560 mm^3 , maximum t value = 3.66]; right frontal lobe [(x, y, z) = ($20, 22, -20$), cluster size = 1560 mm^3 , maximum t value = 4.20]. No significant correlation was found between fermented *Codonopsis lanceolata*-induced gray matter volume increase and cognitive improvement.

Conclusions: A 2-week pretreatment with fermented *Codonopsis lanceolata* ameliorated memory performance in scopolamine-induced memory deficit mice. Also, the clinical study showed that an 8-week oral administration of fermented *Codonopsis lanceolata* can improve attention performance and increase gray matter volume in the frontal lobe. This is the first report to demonstrate the cognitive-enhancing effect and safety of fermented *Codonopsis lanceolata* in humans.

Keywords: fermented *Codonopsis lanceolata*, functional food, cognitive function, subjective cognitive impairment, attention, working memory, voxel-based morphometry

Student number: 2012-20403